(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0022528**

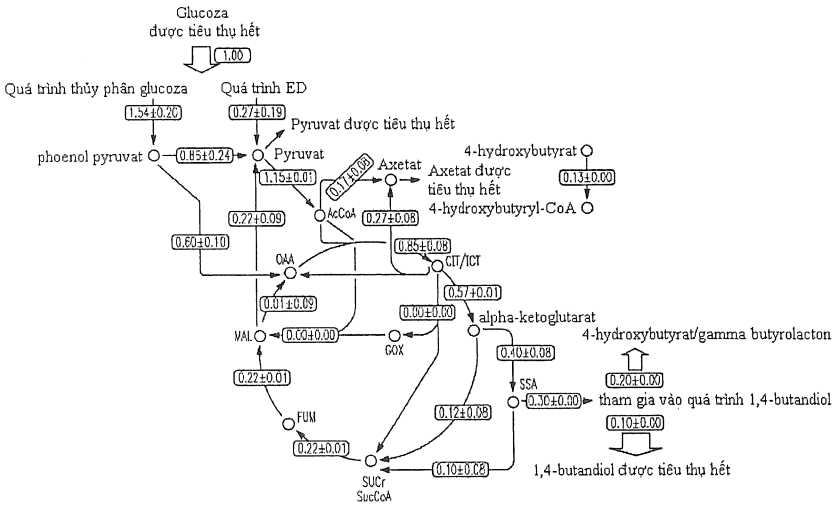
(51)[7] **C12P 7/16**, C12N 1/21, C12P 7/18, C12N 1/00

(13) **B**

(21) 1-2012-00022
(22) 04.06.2010
(86) PCT/US2010/037544 04.06.2010
(87) WO2010/141920A3 09.12.2010
(30) 61/184,311 04.06.2009 US
(45) 25.12.2019 381
(43) 25.05.2012 290
(73) GENOMATICA, INC. (US)
10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121, United States of America
(72) VAN DIEN, Stephen, J. (US), BURGARD, Anthony, P. (US), OSTERHOUT, Robin, E. (US), HASELBECK, Robert (US), PUJOL-BAXLEY, Catherine, J. (US), NIU, Wei (CN), TRAWICK, John, D. (US), YIM, Harry (US), BURK, Mark, J. (US), SUN, Jun (CN)
(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) VI SINH VẬT KHÔNG CÓ TRONG TỰ NHIÊN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT 1,4-BUTANDIOL SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sản sinh 1,4- butandiol (BDO) bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO và còn được tối ưu hóa để biểu hiện 1,4-butandiol. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất 1,4-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc thiết kế sinh vật và kỹ thuật thao tác trên sinh vật *in silico*, cụ thể hơn là đề cập đến các sinh vật có khả năng sinh tổng hợp 1,4-butandiol.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hợp chất axit 4-hydroxybutanoic (4-hydroxybutanoat, 4-hydroxybutyrat, 4-HB) là axit carboxylic có công thức cấu tạo gồm 4 nguyên tử cacbon có khả năng ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp làm nguyên liệu tổng hợp các hóa chất đặc biệt và thông dụng khác nhau. Cụ thể là, axit 4-HB có khả năng ứng dụng làm nguyên liệu đầu vào để tổng hợp nhóm hợp chất hóa học 1,4-butandiol, bao gồm các dung môi, nhựa, tiền chất polyme và hóa chất đặc biệt. Hợp chất 1,4-butandiol (BDO) là dung môi công nghiệp và polyme trung gian với sản lượng tiêu thụ toàn cầu là khoảng 1360800 tấn/năm. Hiện nay, BDO được sản xuất từ các tiền chất hóa dầu, chủ yếu là axetylen, anhydrit maleic và propylen oxit.

Ví dụ, cho axetylen phản ứng với 2 phân tử formaldehyt theo phản ứng tổng hợp Reppe (Kroschwitz and Grant, Enxyclopedia of Chem. Tech., John Wiley and Sons, Inc., New York (1999)), sau đó thực hiện phản ứng hydro hóa có chất xúc tác để thu được 1,4-butandiol. Ước tính được rằng, 90% axetylen sản xuất tại Mỹ được sử dụng để tổng hợp butandiol. Ngoài ra, hợp chất 1,4-butandiol có thể được tổng hợp bằng cách thực hiện quá trình este hóa và hydro hóa có chất xúc tác anhydrit maleic, được tổng hợp từ butan. Butandiol tạo ra có thể tiếp tục được biến đổi; ví dụ, bằng cách oxi hóa tạo ra γ-butyrolacton, hợp chất này có thể tiếp tục được biến đổi thành pyroliđon và N-metyl-pyroliđon hoặc thủy phân thành tetrahydrofuran. Các hợp chất này có ứng dụng khác nhau làm polyme trung gian, dung môi và chất phụ gia với sản lượng tiêu thụ là gần 907200 tấn/năm.

Có nhu cầu phát triển phương pháp để sản xuất các hợp chất hóa học này bằng các phương pháp thay thế, không chỉ thay thế phục hồi được cho nguồn nguyên liệu dầu mỏ mà còn sử dụng ít năng lượng và hạ chi phí quy trình sản xuất. Cơ quan năng lượng Mỹ đã đề xuất các 1,4-diaxit và đặc biệt là, axit suxinic, làm các hợp chất trung gian được sinh tổng hợp để sản xuất nhóm hợp chất butandiol (DOE Report, "Top Value- Added

Chemicals from Biomass", 2004). Tuy nhiên, để phân lập và tinh chế axit suxinic đòi hỏi chi phí cao và nhiệt độ, áp suất lớn để khử xúc tác thành butandiol.

Do đó, có nhu cầu về các phương pháp thay thế để sản xuất hiệu quả 1,4-butandiol và các tiền chất hóa học của nó với sản lượng thương mại. Sáng chế đáp ứng nhu cầu này cũng như đề xuất các ưu điểm liên quan.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sản sinh 1,4-butandiol (BOD) bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO và được tối ưu hóa để biểu hiện BDO. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng các vi sinh vật này để sản xuất BDO.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện các quá trình sinh hóa để sinh tổng hợp 4-hydroxybutyrat (4-HB) và 1,4-butandiol. Năm giai đoạn đầu tiên là nội sinh đối với *E. coli*, trong khi các giai đoạn còn lại có thể được biểu hiện không cùng loại. Các enzym xúc tác phản ứng sinh tổng hợp bao gồm: (1) suxinyl-CoA syntetaza; (2) Suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA; (3) α-ketoglutarat dehydrogenaza; (4) glutamat: suxinat semialdehyt transaminaza; (5) glutamat decarboxylaza; (6) suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA; (7) 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza; (8) α-ketoglutarat decarboxylaza; (9) 4-hydroxybutyryl CoA: axetyl-CoA transferaza; (10) butyrat kinaza; (11) phosphotransbutyrylaza; (12) aldehyt dehydrogenaza; (13) rượu dehydrogenaza.

Fig.2 là biểu đồ thể hiện quá trình sinh tổng hợp homoserin ở *E. coli*.

Fig.3 thể hiện quá trình sản sinh 4-HB trên môi trường tối thiểu chứa glucoza sử dụng các chủng *E.coli* có plasmit biểu hiện các tổ hợp gen tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB khác nhau, (a) nồng độ của 4-HB trong canh trường nuôi cấy; (b) nồng độ của suxinat trong canh trường nuôi cấy; (c) mật độ quang OD của canh trường nuôi cấy, đo được ở bước sóng 600nm. Các cụm biểu đồ cột thể hiện các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ (nếu đo được). Các mã dọc theo trục X biểu thị tổ hợp chủng vi sinh vật/plasmit được sử dụng. Chỉ số thứ nhất chỉ chủng vi sinh vật chủ: 1, MG1655 $lacI^Q$; 2, MG1655 ΔgabD $lacI^Q$; 3, MG1655 ΔgabD ΔaldA $lacI^Q$. Chỉ số thứ hai chỉ tổ hợp plasmit được sử dụng: 1, pZE13-0004-0035 và pZA33-0036; 2, pZE13-0004-0035 và pZA33-0010n; 3, pZE13-

0004-0008 và pZA33-0036; 4, pZE13-0004-0008 và pZA33-0010n; 5, các vectơ đối chứng pZE13 và pZA33.

Fig.4 thể hiện quá trình sản sinh 4-HB từ glucoza ở các chủng *E.coli* biểu hiện α-ketoglutarat decarboxylaza từ *Mycobacterium tuberculosis*. Các chủng vi sinh vật 1-3 chứa pZE13-0032 và pZA33-0036. Chủng vi sinh vật 4 chỉ biểu hiện các vectơ trống pZE13 và pZA33. Các chủng vi sinh vật chủ là như sau: 1 và 4, MG1655 $lacI^Q$; 2, MG1655 ΔgabD $lacI^Q$; 3, MG1655 ΔgabD ΔaldA $lacI^Q$. Các biểu đồ cột là nồng độ tại thời điểm 24 giờ và 48 giờ.

Fig.5 thể hiện quá trình sản sinh BDO từ 10mM 4-HB ở các chủng *E.coli* tái tổ hợp. Các vị trí đánh số tương ứng với các thử nghiệm với MG1655 $lacI^Q$ chứa pZA33-0024, biểu hiện gen cat2 thu được từ *P. gingivalis* và các gen sau được biểu hiện trên pZE13: 1, không (đối chứng); 2, 0002; 3, 0003; 4, 0003n; 5, 0011; 6, 0013; 7, 0023; 8, 0025; 9, 0008n; 10, 0035. Số gen được định nghĩa trong bảng 6. Đối với mỗi vị trí, các biểu đồ cột tương ứng với các điều kiện hiếu khí, vi hiếu khí và kỵ khí. Điều kiện vi hiếu khí được tạo ra bằng cách bịt kín các ống nuôi cấy nhưng không hút chân không các ống này.

Fig.6 thể hiện phổ khối của 4-HB và BDO được sinh tổng hợp bởi chủng MG1655 $lacI^Q$ pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036 được nuôi cấy trên môi trường tối thiểu M9 có bổ sung 4g/L glucoza không được đánh dấu đồng vị (a, c, e và g), glucoza được đánh dấu đồng vị ^{13}C đồng nhất (b, d, f và h). (a) và (b), phổ khối 116 đoạn đặc trưng của BDO được tạo dẫn xuất, chứa 2 nguyên tử cacbon; (c) và (d), phổ khối 177 đoạn đặc trưng của BDO được tạo dẫn xuất, chứa 1 nguyên tử cacbon; (e) và (f), phổ khối 117 đoạn đặc trưng của 4-HB được tạo dẫn xuất, chứa 2 nguyên tử cacbon; (g) và (h), phổ khối 233 đoạn đặc trưng của 4-HB được tạo dẫn xuất, chứa 4 nguyên tử cacbon.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện quá trình sản sinh γ-butyrolacton. Biểu đồ (a) thể hiện quá trình lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng và phân tách theo mẻ và biểu đồ (b) thể hiện quá trình lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng và phân tách liên tục.

Fig.8A và Fig.8B thể hiện các quá trình sản sinh 1,4-butandiol (BDO) làm ví dụ. Fig.8A thể hiện quá trình sản sinh BDO từ suxinyl-CoA. Fig.8B thể hiện quá trình sản sinh BDO từ alpha-ketoglutarat.

Fig.9A đến Fig.9C thể hiện các quá trình sản sinh BDO làm ví dụ. Fig.9A và Fig.9B thể hiện quá trình sản sinh từ 4-aminobutyrat. Fig.9C thể hiện quá trình sản sinh từ axetoaxetyl-CoA thành 4-aminobutyrat.

Fig.10 thể hiện quá trình sản sinh BDO từ alpha-ketoglutarat làm ví dụ.

Fig.11 thể hiện quá trình sản sinh BDO từ glutamat làm ví dụ.

Fig.12 thể hiện quá trình sản sinh BDO từ axetoaxetyl-CoA làm ví dụ.

Fig.13 thể hiện quá trình sản sinh BDO từ homoserin làm ví dụ.

Fig.14 thể hiện trình tự nucleotit và trình tự axit amin của suxinyl-CoA syntetaza ở chủng *E.coli*. Fig.14A thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO:) của opreon *sucCD* ở *E. coli*. Fig.14B (SEQ ID NO:) và 14C (SEQ ID NO:) thể hiện trình tự axit amin của các tiểu đơn vị suxinyl-CoA syntetaza được mã hóa bởi operon *sucCD*.

Fig.15 thể hiện trình tự nucleotit và trình tự axit amin của alpha-ketoglutarat decarboxylaza ở chủng *Mycobacterium bovis*. Fig.15A thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO:) của gen *sucA* ở *Mycobacterium bovis*. Fig.15B thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO:) của alpha-ketoglutarat decarboxylaza ở *M. bovis*.

Fig.16 thể hiện quá trình sinh tổng hợp 4-hydroxybutyrat ở chủng *E.coli* từ glucoza trên môi trường tối thiểu thông qua alpha-ketoglutarat trong các điều kiện kỵ khí (vi hiếu khí). Chủng vi sinh vật chủ là ECKh-401. Các thử nghiệm này được đánh dấu trên cơ sở các gen của quá trình hướng lên có mặt trên plasmit pZA33 như sau: 1) *4hbd-sucA*; 2) *sucCD-sucD-4hbd*; 3) *sucCD-sucD-4hbd-sucA*.

Fig.17 thể hiện quá trình sinh tổng hợp 4-hydroxybutyrat ở chủng E.coli từ glucoza trên môi trường tối thiểu thông qua suxinat và alpha-ketoglutarat. Vi sinh vật chủ là chủng MG1655 tự nhiên. Các thử nghiệm này được đánh dấu trên cơ sở các gen có mặt trên các plasmit pZE13 và pZA33 như sau: 1) các vectơ đối chứng trống 2) pZE13, pZA33-4hbd trống; 3) pZE13-sucA, pZA33-4hbd.

Fig.18 A thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO:) mã hóa cho suxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA (*sucD*) từ *Porphyromonas gingivalis* và Fig.18B thể hiện trình tự axit amin được mã hóa (SEQ ID NO:).

Fig.19A thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO:) mã hóa cho 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza (*4hbd*) từ *Porphyromonas gingivalis* và Fig.19B thể hiện trình tự axit amin được mã hóa (SEQ ID NO:).

Fig.20A thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO:) mã hóa cho 4-hydroxybutyrat CoA transferaza (*cat2*) từ *Porphyromonas gingivalis* và Fig.20B thể hiện trình tự axit amin được mã hóa (SEQ ID NO:).

Fig.21A thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO:) mã hóa cho phosphotransbutyrylaza (*ptb*) từ *Clostridium acetobutylicum* và Fig.21B thể hiện trình tự axit amin được mã hóa (SEQ ID NO:).

Fig.22A thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO:) mã hóa cho butyrat kinaza (*buk1*) từ *Clostridium acetobutylicum* và Fig.22B thể hiện trình tự axit amin được mã hóa (SEQ ID NO:).

Fig.23 thể hiện trình tự nucleotit thay thế đối với *C.acetobutylicum* 020 (phosphtransbutyrylaza) có các bộ ba mã hóa biến đối với các bộ ba mã hóa phổ biến hơn ở chủng *E.coli* so với trình tự tự nhiên của chủng *C.acetobutylicum*. Fig.23A đến 23D (tương ứng là, 020A-020D, các SEQ ID NO:) chứa các trình tự cùng với tăng số lượng các bộ ba mã hóa hiếm gặp ở chủng *E.coli* được thay thế bằng các bộ ba mã hóa phổ biến hơn (A<B<C<D).

Fig.24 thể hiện trình tự nucleotit thay thế đối với *C. axetobuytlicum* 021 (butyrat kinaza) có các bộ ba mã hóa biến đối với các bộ ba mã hóa phổ biến hơn ở chủng *E.coli* so với trình tự tự nhiên của chủng *C. acetobutylicum*. Fig.24A đến 24D (tương ứng là, 021A-021B, các SEQ ID NO:) chứa các trình tự cùng với tăng số lượng các bộ ba mã hóa hiếm gặp ở chủng *E.coli* được thay thế bằng các bộ ba mã hóa phổ biến hơn (A<B<C<D).

Fig.25 thể hiện quá trình biểu hiện được cải thiện của butyrat kinaza (BK) và phosphotransbutyrylaza (PTB) có các bộ ba mã hóa được tối ưu để biểu hiện ở chủng *E.coli*. Fig.25A thể hiện quá trình điện di trên gel natri dodexyl sulfat polyacrylamit (SDS-PAGE) đã được nhuộm các protein bằng xanh Coomassie; băng 1, vectơ đối chứng không được chèn; băng 2, sự biểu hiện của trình tự tự nhiên thu được từ chủng *C. acetobutylicum* ở chủng *E.coli*; băng 3, sự biểu hiện của PTB-BK được tối ưu bộ ba mã hóa 020B-021B; băng 4, sự biểu hiện của PTB-BK được tối ưu bộ ba mã hóa 020C-021C. Các vị trí của BK và PTB được thể hiện. Fig.25B thể hiện hoạt tính BK và PTB của trình tự tự nhiên thu

được từ chủng *C. acetobutylicum* (2021n) so với bộ ba mã hóa được tối ưu 020B-021B (2021B) và 020C-021C (2021C).

Fig.26 thể hiện quá trình sản sinh BDO và gama-butyrylacton (GBL) ở các chủng khác nhau biểu hiện các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO: Cat2 (034); 2021n; 2021B; 2021C.

Fig.27A thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO:) của gen *ald* thu được từ chủng *Clostridium biejerinckii* tự nhiên (025n) và Fig.27B thể hiện trình tự axit amin được mã hóa (SEQ ID NO:).

Fig.28A đến 28D thể hiện trình tự gen thay thế cho gen *ald* của *Clostridium beijerinckii* (tương ứng là, 025A-025D, các SEQ ID NO:), trong đó tăng số lượng các bộ ba mã hóa hiếm gặp được thay thế bằng các bộ ba mã hóa phổ biến hơn (A<B<C<D).

Fig.29 thể hiện sự biểu hiện của gen *ald* thu được từ chủng *C. beijerinckii* tự nhiên và các biến dị được tối ưu bộ ba mã hóa; không chèn (đối chứng không chèn), 025n, 025A, 025B, 025C, 025D.

Fig.30 thể hiện quá trình sản sinh BDO hoặc BDO và etanol ở các chủng khác nhau. Fig.30 thể hiện quá trình sản sinh BDO ở các chủng chứa gen *ald* thu được từ *C. beijerinckii* tự nhiên (025n) hoặc các biến dị có các bộ ba mã hóa được tối ưu để biểu hiện ở chủng *E.coli* (025A-025D). Fig.30B thể hiện quá trình sản sinh etanol và BDO ở các chủng biểu hiện enzym AdhE2 của *C.acetobutylicum* (002C) so với biến dị 025B được tối ưu bộ ba mã hóa. Tập hợp thứ ba thể hiện sự biểu hiện của gen *sucD* từ *P.gingivalis* (035). Trong tất cả các trường hợp, gen *cat2* (034) của *P. gingivalis* cũng được biểu hiện.

Fig.31A thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO:) của gen *adh1* thu được từ *Geobacillus thermoglucosidasius* và Fig.31B thể hiện trình tự axit amin được mã hóa (SEQ ID NO:).

Fig.32A thể hiện sự biểu hiện của gen *adh1* từ *Geobacillus thermoglucosidasius* ở chủng *E.coli*. Toàn bộ dịch phân giải hoặc dịch nổi tế bào được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE và nhuộm bằng xanh Coomassie để phát hiện plasmit không được chèn, plasmit có đoạn chèn 083 (N-benzyl-3-pyrrolidinol dehydrogenaza của *Geotrichum capitatum*) và plasmit có đoạn chèn 084 (*adh1* của *Geobacillus thermoglucosidasius*). Fig.32B thể hiện hoạt tính của 084 với butyraldehyt (các hình thoi) hoặc 4-hydroxybutyraldehyt (các hình vuông) làm cơ chất.

Fig.33 thể hiện quá trình sản sinh BDO ở các chủng khác nhau: plasmit không được chèn; 025B, 025B-026n; 025B-026A; 025B-026B; 025B-026C; 025B-050; 025B-052; 025B-053; 025B-055; 025B-057; 025B-058; 025B-071; 025B-083; 025B-084; PTSlacO-025B; PTSlacO-025B-026n.

Fig.34 thể hiện bản đồ plasmit đối với vectơ pRE119-V2.

Fig.35 thể hiện trình tự của vùng ECKh-138 bao gồm các gen *aceF* và *lpdA*. Gen *lpdA* của *K.pneumonia* được gạch chân và bộ ba mã hóa được biến đổi ở đột biến Glu354Lys được tô đậm dần.

Fig.36 thể hiện so sánh trình tự protein giữa gen *lpdA* của *E.coli* tự nhiên và gen *lpdA* của *K.pneumonia* đột biến.

Fig.37 thể hiện quá trình sản sinh 4-hydroxybutyrat (các cột bên trái) và BDO (các cột bên phải) ở các chủng AB3, MG1655 Δ1dhA và ECKh-138, Tất cả các chủng biểu hiện gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucCD* của *P.gingivalis*, gen *4hbd* của *P.gingivalis* trên plasmit pZA33 bản sao trung bình và gen *Cat2* của *P.gingivalis*, gen *AdhE2* của *C.acetobutylicum* trên plasmit pZE13 bản sao cao.

Fig.38 thể hiện trình tự nucleotit đầu 5' của gen *aceE* được dung hợp với trình tự khởi đầu pflB-p6 và vị trí gắn kết ribosom (ribosome binding site-RBS). Trình tự được in nghiêng ở đầu 5' thể hiện điểm bắt đầu của gen *aroP*, được phiên mã theo chiều ngược lại từ operon *pdh*. Trình tự được in nghiêng ở đầu 3' thể hiện điểm bắt đầu của gen *aceE*. Trong trường hợp trên: pflB RBS. Gạch chân: vị trí gắn kết FNR. In đậm: trình tự khởi đầu pflB-p6,

Fig.39 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO:) của vùng *aceF-lpdA* ở chủng ECKh-456.

Fig.40 thể hiện quá trình sản sinh 4-hydroxybutyrat, BDO và pyruvat (tương ứng là, các cột từ trái sang phải) đối với mỗi chủng ECKh-439, ECKh-455 và ECKh-456,

Fig.41 A thể hiện sơ đồ các vị trí tái tổ hợp để loại bỏ gen *mdh*. Fig.41B thể hiện trình tự của sản phẩm PCR của quá trình khuếch đại gen kháng cloramphenicol (CAT) được áp hai bên bằng các vị trí FRT và vùng tương đồng của gen *mdh* từ plamit pKD3.

Fig.42 thể hiện trình tự của vùng được loại bỏ gen *arcA* ở chủng ECKh-401.

Fig.43 thể hiện trình tự của vùng bao gồm gen *gltA* đột biến của chủng ECKh- 422.

Fig.44 thể hiện hoạt tính của enzym xitrat syntaza của sản phẩm gen *gltA* tự nhiên và đột biến R163L. Thử nghiệm được thực hiện khi không có mặt (các hình thoi) hoặc có mặt 0,4mM NADH (các hình vuông).

Fig.45 thể hiện quá trình sản sinh 4-hydroxybutyrat (các cột bên trái) và BDO (các cột bên phải) ở các chủng ECKh-401 và ECKh-422, cả hai chủng này biểu hiện các gen cho toàn bộ quá trình sản sinh BDO trên các plasmit.

Fig.46 thể hiện các dòng chuyển hóa trung tâm và khoảng tin cậy 95% đi kèm từ các thử nghiệm đánh dấu chuyển hóa. Các trị số là các thông lượng mol được chuẩn hóa theo tốc độ hấp thu glucoza là 1mmol/giờ. Kết quả cho thấy rằng thông lượng cacbon được định hướng thông qua xitrat syntaza theo hướng oxi hóa và hầu hết cacbon tham gia vào quá trình sản sinh BDO hơn là hoàn thành chu trình TCA.

Fig.47 thể hiện quá trình hình thành sản phẩm ngoại bào đối với các chủng ECKh-138 và ECKh-422, cả hai chủng này biểu hiện toàn bộ quá trình sản sinh BDO trên các plasmit. Các sản phẩm xác định được bao gồm: axetat (Ace), pyruvat (Pyr), 4-hydroxybutyrat (4HB), 1,4-butandiol (BDO), etanol (EtOH) và các sản phẩm khác bao gồm: gama-butyrolacton (GBL), suxinat và lactat.

Fig.48 thể hiện trình tự của vùng sau khi thay thế PEP carboxylaza (ppc) bằng phosphoenolpyruvat carboxykinaza (pepck) của *H.influenzae*. Vùng mã hóa cho pepck được gạch chân.

Fig.49 thể hiện quá trình sinh trưởng của các chủng pepCK tiến hóa được nuôi cấy trên môi trường tối thiểu chứa 50mM $NaHCO_3$.

Fig.50 thể hiện quá trình hình thành sản phẩm ở chủng ECKh-453 biểu hiện gen Cat2 của *P.gingivalis* và gen Ald của *C.beijerinckii* trên plasmit pZS*13. Các sản phẩm xác định được bao gồm 1,4-butandiol (BDO), pyruvat, 4-hydroxybutyrat (4HB), axetat, γ-butyrolacton (GBL) và etanol.

Fig.51 thể hiện quá trình sản sinh BDO ở hai chủng, ECKh-453 và ECKh-432. Cả hai chủng này chứa plasmit pZS*13 biểu hiện gen Cat2 của *P.gingivalis* và gen Ald của *C.beijerinckii*. Các chủng này được sinh trưởng trong điều kiện vi hiếu khí, trong các bình nuôi cấy được tạo lỗ bằng 27 hoặc 18 kim định cỡ, như đã được chỉ ra.

Fig.52 thể hiện trình tự nucleotit của ADN thuộc bộ gen của chủng ECKh-426 ở vùng chèn đoạn ADN polycistronic chứa trình tự khởi đầu, gen *sucCD*, gen *sucD*, gen *4hbd* và trình tự kết thúc.

Fig.53 thể hiện trình tự nucleotit thuộc vùng nhiễm sắc thể của chủng ECKh-432 ở vùng chèn trình tự polycistronic chứa trình tự khởi đầu, gen *sucA*, gen *4hbd* của *C. kluyveri* và trình tự kết thúc.

Fig.54 thể hiện quá trình sản sinh BDO từ glucoza trên môi trường tối thiểu ở chủng ECKh-432 mang các gen mã hóa quá trình sản sinh BDO ngược chiều được liên hợp vào nhiễm sắc thể và chứa plasmit mang các gen mã hóa quá trình sản sinh BDO xuôi chiều.

Fig.55 thể hiện sản phẩm PCR chứa gen sử dụng sucroza không-phosphotransferaza (không-PTS) được áp hai bên bằng các vùng tương đồng với vùng *rrnC*.

Fig.56 là biểu đồ thể hiện các vị trí liên hợp ở operon *rrnC*.

Fig.57 thể hiện nồng độ sản phẩm trung bình, được chuẩn hóa đến OD600 của môi trường nuôi cấy, sau 48 giờ nuôi cấy chủng ECKh-432 sinh trưởng trên glucoza và chủng ECKh-463 sinh trưởng trên sucroza. Cả hai chủng này chứa plasmit pZS*13 biểu hiện gen *Cat2* của *P.gingivalis* và gen *ald* của *C.beijerinckii*. Dữ liệu thể hiện 6 canh trường nuôi cấy lặp lại của mỗi chủng. Các sản phẩm xác định được bao gồm 1,4-butandiol (BDO), 4-hydroxybutyrat (4HB), γ-butyrolacton (GBL), pyruvat (PYR) và axetat (ACE) (tương ứng là, các cột từ trái sang phải).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp thiết kế và sản xuất các tế bào và vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic (4-HB), γ-butyrolacton và 1,4-butandiol (BDO). Cụ thể là, sáng chế đề xuất phương pháp thiết kế vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp BDO bằng cách đưa vào một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO.

Theo một phương án, sáng chế sử dụng các mô hình hợp thức *in silico* của quá trình chuyển hóa ở *Escherichia coli* mà xác định các thiết kế chuyển hóa cho quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic (4-HB) và 1,4-butandiol (BDO). Các kết quả được mô tả theo sáng chế cho thấy rằng các quá trình chuyển hóa có thể được thiết kế và sắp đặt

theo cách tái tổ hợp để thu được quá trình sinh tổng hợp 4-HB và các sản phẩm tạo ra như 1,4-butandiol ở *Escherichia coli* và các tế bào hoặc vi sinh vật khác. Quá trình sinh tổng hợp 4-HB, ví dụ, đối với các thiết kế *in silico* có thể được khẳng định bằng cách tạo ra các chủng có kiểu gen chuyển hóa được thiết kế. Các vi sinh vật hoặc tế bào được thiết kế chuyển hóa này cũng có thể được trải qua quá trình tiến hóa thích nghi để tiếp tục làm tăng quá trình sinh tổng hợp 4-HB, bao gồm trong các điều kiện tiệm cận quá trình sinh trưởng tối đa lý thuyết.

Theo một số phương án, các đặc tính sinh tổng hợp 4-HB của các chủng được thiết kế làm cho các chủng này ổn định về mặt di truyền và đặc biệt hữu ích trong các quy trình sinh học liên tục. Các phương pháp thiết kế chủng riêng biệt đã được xác định liên hợp với các khả năng phản ứng không tương đồng hoặc không có nguồn gốc tự nhiên khác nhau vào *E. coli* hoặc các sinh vật chủ khác để tạo ra các quá trình chuyển hóa sinh tổng hợp 4-HB và 1,4-butandiol từ hoặc suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, suxinyl-CoA syntetaza và suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA hoặc glutamat: suxinic semialdehyt transaminaza. Các thiết kế chuyển hóa *in silico* này đã được xác định là tạo ra quá trình sinh tổng hợp 4-HB ở cả *E.coli* và các chủng nấm men từ mỗi quá trình chuyển hóa này. Hợp chất trung gian γ-butyrolacton của 1,4-butandiol có thể được tạo ra trong canh trường nuôi cấy thông qua quá trình tạo vòng tự nhiên dưới các điều kiện ở pH<7,5, cụ thể là dưới các điều kiện axit, như dưới pH 5,5, ví dụ, pH<7, pH<6,5, pH<6 và cụ thể là ở pH<5,5 hoặc thấp hơn.

Các chủng được xác định thông qua thành phần điện toán của nền có thể được đưa vào quá trình sản xuất thực tế bằng cách thiết kế di truyền đột biến chuyển hóa dự tính bất kỳ để tạo ra quá trình sinh tổng hợp 4-HB, 1,4-butandiol hoặc chất trung gian khác và/hoặc các sản phẩm phía sau. Theo phương án khác nữa, các chủng biểu hiện quá trình sinh tổng hợp các hợp chất này có thể còn được trải qua quá trình tiến hóa thích nghi để tiếp tục tăng sinh tổng hợp sản phẩm. Mức độ hiệu suất của quá trình sinh tổng hợp sản phẩm sau khi tiến hóa thích nghi cũng có thể được dự đoán bằng thành phần điện toán của hệ thống.

Theo các phương án cụ thể khác, các vi sinh vật được tạo cấu trúc để biểu hiện quá trình sinh tổng hợp 4-HB mã hóa các giai đoạn enzym từ suxinat thành 4-HB và 4-HB-CoA. Sự biểu hiện đồng thời của suxinat coenzym A transferaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza phụ thuộc NAD và 4-

hydroxybutyrat coenzym A transferaza ở vi sinh vật chủ đã tạo ra quá trình sản sinh đáng kể 4-HB so với các vi sinh vật chủ không chứa quá trình sản sinh 4-HB. Theo phương án cụ thể khác, các vi sinh vật sản sinh 4-HB được tạo ra sử dụng alpha-ketoglutarat làm cơ chất bằng cách chèn thêm các axit nucleic mã hóa alpha-ketoglutarat decarboxylaza và 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza phụ thuộc NAD.

Theo một phương án cụ thể khác, các vi sinh vật có quá trình sản sinh 1,4-butandiol (BDO) được tạo cấu trúc mà BDO được sinh tổng hợp khi được nuôi cấy trong điều kiện có mặt 4-HB. Quá trình sản sinh BDO này bao gồm axit nucleic mã hóa aldehyt/rượu dehydrogenaza đa chức hoặc các axit nucleic mã hóa aldehyt dehydrogenaza và rượu dehydrogenaza. Để hỗ trợ quá trình sinh trưởng trên cơ chất 4-HB, các vi sinh vật sản sinh BDO này còn biểu hiện 4-hydroxybutyrat CoA transferaza hoặc 4-butyrat kinaza kết hợp với phosphotranshydroxybutyrlaza. Theo phương án cụ thể khác nữa, các vi sinh vật này được tạo ra mà BDO được sinh tổng hợp thông qua sự biểu hiện ngoại sinh của các axit nucleic mã hóa quá trình sản sinh 4-HB chức năng và quá trình sản sinh BDO chức năng. Quá trình sản sinh 4-HB bao gồm suxinat coenzym A transferaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza phụ thuộc NAD và 4-hydroxybutyrat coenzym A transferaza. Quá trình sản sinh BDO bao gồm aldehyt/rượu dehydrogenaza đa chức. Sáng chế còn đề xuất các quá trình bổ sung để sinh tổng hợp BDO (tham khảo Fig.8-13).

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "không có trong tự nhiên" được sử dụng khi đề cập đến vi khuẩn hoặc vi sinh vật của sáng chế để chỉ vi sinh vật có ít nhất một gây đột biến thường không được tìm thấy ở chủng có trong tự nhiên thuộc loài tham chiếu, bao gồm các chủng tự nhiên của loài tham chiếu. Các gây đột biến này bao gồm, ví dụ, đột biến chèn thêm các axit nucleic có thể biểu hiện mã hóa polypeptit chuyển hóa, đột biến bổ sung axit nucleic khác, đột biến loại bỏ axit nucleic và/hoặc đột biến phá vỡ chức năng khác của vật chất di truyền của vi sinh vật. Đột biến này bao gồm, ví dụ, các đoạn chức năng và vùng mã hóa của chúng, cho các polypeptit không tương đồng, tương đồng hoặc cả các polypeptit không tương đồng và tương đồng đối với loài tham chiếu. Đột biến bổ sung bao gồm, ví dụ, các vùng điều hòa không mã hóa trong đó, các đột biến này làm thay đổi sự biểu hiện của gen hoặc operon. Ví dụ về polypeptit chuyển hóa bao gồm các enzym hoặc protein tham gia vào quá trình sản sinh nhóm các hợp chất BDO.

Đột biến chuyển hóa chỉ phản ứng sinh hóa được biến đổi từ trạng thái có trong tự nhiên của phản ứng này. Do đó, các vi sinh vật không có trong tự nhiên có gây đột biến đối với các axit nucleic mã hóa polypeptit chuyển hóa hoặc các đoạn chức năng của chúng. Ví dụ về các đột biến chuyển hóa được bộc lộ trong sáng chế.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "được phân lập" được sử dụng khi đề cập đến vi sinh vật chỉ vi sinh vật gần như không chứa ít nhất một thành phần như vi sinh vật tham chiếu được tìm thấy trong tự nhiên. Thuật ngữ này bao gồm vi sinh vật được loại bỏ một số hoặc tất cả các thành phần như được tìm thấy trong môi trường tự nhiên của vi sinh vật đó. Thuật ngữ này cũng bao gồm vi sinh vật được loại bỏ một số hoặc tất cả các thành phần như vi sinh vật được tìm thấy từ môi trường không có trong tự nhiên. Do đó, vi sinh vật được phân lập được phân tách một phần hoặc hoàn toàn ra khỏi các cơ chất khác khi vi sinh vật này được tìm thấy trong tự nhiên hoặc khi vi sinh vật đó được nuôi cấy, bảo quản hoặc tồn tại trên các môi trường không có trong tự nhiên. Ví dụ cụ thể về các vi sinh vật được phân lập bao gồm các vi sinh vật thuần chủng một phần, vi sinh vật hầu như thuần chủng và vi sinh vật được nuôi cấy trên môi trường không có trong tự nhiên.

Như được sử dụng trong sáng chế, các thuật ngữ "thuộc vi sinh vật" "vi khuẩn" hoặc "vi sinh vật" được sử dụng để chỉ sinh vật bất kỳ tồn tại dưới dạng tế bào có kích thước hiển vi thuộc các lĩnh giới cổ khuẩn, vi khuẩn hoặc sinh vật nhân thật. Do đó, thuật ngữ này bao gồm các tế bào hoặc sinh vật tiền nhân hoặc nhân thật có kích thước hiển vi và bao gồm vi khuẩn, cổ khuẩn và vi khuẩn thực của tất cả loài cũng như các vi sinh vật nhân thật như nấm men và nấm. Thuật ngữ này cũng bao gồm các canh trường tế bào của loài bất kỳ có thể được nuôi cấy trong quá trình tổng hợp sinh hóa.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "axit 4-hydroxybutanoic" được sử dụng để chỉ dẫn xuất 4-hydroxy của axit butyric có công thức hóa học $C_4H_8O_3$ và khối lượng phân tử là 104,11g/mol (126,09g/mol đối với muối natri của nó). Hợp chất hóa học axit 4-hydroxybutanoic còn được biết đến trong lĩnh vực này với các danh pháp như 4-HB, 4-hydroxybutyrat, axit gama 4-hydroxybutyric hoặc GHB. Thuật ngữ này khi được sử dụng trong sáng chế bao gồm bất kỳ dạng muối khác nhau của hợp chất và bao gồm, ví dụ, 4-hydroxybutanoat và 4-hydroxybutyrat. Ví dụ cụ thể về các dạng muối của 4-HB bao gồm natri 4-HB và kali 4-HB. Do đó, các thuật ngữ axit 4-hydroxybutanoic, 4-HB, 4-hydroxybutyrat, 4-hydroxybutanoat, axit gama 4-hydroxybutyric và GHB cũng như các

danh pháp khác được công nhận trong lĩnh vực này được sử dụng đồng nghĩa như trong sáng chế.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "monome" được sử dụng khi đề cập đến 4-HB chỉ 4-HB ở dạng không polyme hoặc không được tạo dẫn xuất. Ví dụ cụ thể về dạng polyme của 4-HB bao gồm poly-axit 4-hydroxybutanoic và copolyme của, ví dụ, 4-HB và 3-HB. Ví dụ cụ thể về dạng dẫn xuất của 4-HB là 4-HB-CoA. Các dạng polyme của 4-HB khác và các dạng dẫn xuất khác của 4-HB cũng được biết đến trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "γ-butyrolacton" được sử dụng để chỉ lacton có công thức hóa học $C_4H_6O_2$ và khối lượng phân tử là 86,089g/mol. Hợp chất hóa học γ-butyrolacton còn được biết đến trong lĩnh vực này với các danh pháp như GBL, butyrolacton, 1,4-lacton, 4-butyrolacton, axit 4-hydroxybutyric lacton và axit gama 4-hydroxybutyric lacton. Thuật ngữ này khi được sử dụng trong sáng chế bao gồm dạng muối khác nhau bất kỳ của hợp chất.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "1,4-butandiol" được sử dụng để chỉ dẫn xuất rượu của alkan butan, chứa hai nhóm hydroxyl và có công thức hóa học $C_4H_{10}O_2$ và khối lượng phân tử là 90,12g/mol. Hợp chất hóa học 1,4-butandiol còn được biết đến trong lĩnh vực này với các danh pháp như BDO và là hợp chất trung gian hoặc tiền chất hóa học của nhóm hợp chất được đề cập trong sáng chế là nhóm hợp chất BDO.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "tetrahydrofuran" được sử dụng để chỉ hợp chất hữu cơ dị vòng tương ứng với chất đồng đẳng được hydro hóa hoàn toàn của hợp chất thơm furan và có công thức hóa học C_4H_8O và khối lượng phân tử là 72,11g/mol. Hợp chất hóa học tetrahydrofuran còn được biết đến trong lĩnh vực này với các danh pháp như THF, tetrahydrofuran, 1,4-epoxybutan, butylen oxit, xyclotetrametylen oxit, oxaxyclopentan, dietylen oxit, oxolan, furanidin, hydrofuran, tetra-metylen oxit. Thuật ngữ này khi được sử dụng trong sáng chế bao gồm dạng muối khác nhau bất kỳ của tetrahydrofuran.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "CoA" hoặc "coenzym A" được sử dụng để chỉ đồng nhân tố hữu cơ hoặc nhóm phụ (phần không có bản chất protein của enzym) sự có mặt của đồng nhân tố hoặc nhóm phụ này là cần thiết để tạo ra hoạt tính của nhiều enzym (apoenzym) để tạo thành phức hệ enzym có hoạt tính. Coenzym A thực hiện chức năng ở một số enzym ngưng tụ, tham gia vào các quá trình chuyển nhóm axetyl hoặc

nhóm axyl khác, sinh tổng hợp và oxi hóa axit béo, oxi hóa pyruvat và quá trình axetyl hóa khác.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "gần như kỵ khí" được sử dụng để chỉ điều kiện sinh trưởng hoặc nuôi cấy có hàm lượng khí oxi hòa tan trong các môi trường lỏng là nhỏ hơn 10% hàm lượng bão hòa. Thuật ngữ này cũng được sử dụng để chỉ các khoang chứa môi trường lỏng hoặc rắn được bịt kín được duy trì với không khí có ít hơn 1% oxi.

Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể chứa các gây đột biến ổn định, tức là các vi sinh vật có thể được nuôi cấy qua hơn năm thế hệ mà không mất các đột biến này. Nói chung, các gây đột biến ổn định bao gồm các đột biến truyền lại qua hơn 10 thế hệ, cụ thể là các đột biến ổn định sẽ truyền lại qua hơn 25 thế hệ và cụ thể hơn là, các đột biến ổn định sẽ truyền lại qua hơn 50 thế hệ, bao gồm không giới hạn số lượng thế hệ.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các gây đột biến, bao gồm các đột biến chuyển hóa được lấy làm ví dụ trong sáng chế được mô tả kết hợp tham chiếu sinh vật nguồn thích hợp như *E. coli*, nấm men hoặc các sinh vật khác được bộc lộ trong sáng chế và các phản ứng chuyển hóa tương ứng của chúng hoặc sinh vật nguồn thích hợp đối với vật chất di truyền mong muốn như các gen mã hóa enzym xúc tác phản ứng chuyển hóa tương ứng của chúng. Tuy nhiên, dựa trên việc giải trình tự bộ gen hoàn chỉnh của một loạt các vi sinh vật và trình độ khoa học kỹ thuật trong lĩnh vực gen, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể dễ dàng sử dụng các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế cho hầu như toàn bộ các vi sinh vật khác. Ví dụ, các đột biến chuyển hóa của *E. coli* được minh họa trong sáng chế có thể dễ dàng sử dụng cho loài khác bằng cách liên hợp axit nucleic mã hóa đồng đẳng hoặc hợp chất tương tự từ loài khác với loài tham chiếu. Các biến đổi di truyền này bao gồm, ví dụ, các biến đổi di truyền của loài tương đồng và nhìn chung cụ thể là, các gen trực giao (ortholog), gen bản sao (paralog) hoặc chuyển vị gen không trực giao.

Gen trực giao là gen hoặc các gen có mối liên hệ di truyền theo chiều dọc và thực hiện các chức năng giống nhau hoặc gần như tương tự ở các sinh vật khác nhau. Ví dụ, epoxit hydrolaza ở chuột và epoxit hydrolaza ở người có thể được xem là các gen trực giao đối với chức năng sinh học là thủy phân các epoxit. Các gen có mối liên hệ di truyền theo chiều dọc khi, ví dụ, các gen này có chung độ tương đồng về trình tự với lượng đủ để chỉ ra rằng chúng là các gen tương đồng hoặc có chung quá trình tiến hóa từ gen gốc. Các

gen cũng có thể được xem là các gen trực giao nếu chúng có cùng cấu trúc không gian ba chiều, nhưng không nhất thiết phải có độ tương đồng về trình tự, với lượng đủ để chỉ ra rằng các gen này có chung quá trình tiến hóa từ gen gốc đến mức mà độ tương đồng về trình tự ban đầu không thể xác định được. Các gen mà là các gen trực giao có thể mã hóa các protein có độ tương đồng về trình tự nằm trong khoảng từ 25% đến 100% độ tương đồng về trình tự axit amin. Các gen mã hóa protein có chung độ tương đồng axit amin dưới 25% cũng có thể được xem là có chung quá trình tiến hóa thẳng nếu cấu trúc không gian ba chiều của chúng cũng thể hiện độ tương đồng. Các enzym thuộc họ serin proteaza, bao gồm yếu tố hoạt hóa plasminogen và elastaza của mô, được coi là có chung quá trình tiến hóa thẳng từ gen gốc.

Các gen trực giao bao gồm các gen hoặc sản phẩm gen được mã hóa của chúng mà thông qua, ví dụ, quá trình tiến hóa, đã phân kỳ về cấu trúc hoặc hoạt tính toàn phần. Ví dụ, khi một loài mã hóa sản phẩm gen biểu hiện hai chức năng và khi các chức năng này đã được phân tách thành các gen riêng biệt ở loài thứ hai, ba gen này và các sản phẩm tương ứng của chúng được xem như là các gen trực giao. Đối với quá trình sản sinh sản phẩm sinh hóa đi kèm với quá trình sinh trưởng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng gen trực giao có hoạt tính chuyển hóa bị phá vỡ được lựa chọn để tạo ra vi sinh vật không có trong tự nhiên. Ví dụ về các gen trực giao biểu hiện các hoạt tính phân tách được, là các hoạt tính khác biệt đã được phân tách thành các sản phẩm gen riêng biệt giữa hai hoặc nhiều loài hoặc trong phạm vi một loài duy nhất. Ví dụ cụ thể là sự phân tách giữa elastaza thủy phân protein và plasminogen thủy phân protein, hai dạng hoạt tính serin proteaza, thành các phân tử riêng biệt là yếu tố hoạt hóa plasminogen và elastaza. Ví dụ thứ hai là sự phân tách giữa mycoplasma 5'-3' exonucleaza và hoạt tính của ADN polymeaza III của *Drosophila*. ADN polymeaza từ loài thứ nhất có thể được xem là gen trực giao với một trong hai hoặc cả hai enzym exonucleaza và polymeraza từ loài thứ hai và ngược lại.

Ngược lại, các gen bản sao là các đồng đẳng có mối liên hệ di truyền ví dụ, bởi quá trình tái bản sau đó phân kỳ tiến hóa và có độ tương đồng hoặc tương tự, nhưng không có chức năng giống nhau. Các gen bản sao có thể có nguồn gốc hoặc thu được từ, ví dụ, cùng một loại hoặc từ một loài khác. Ví dụ, epoxit hydrolaza của vi lạp thể (epoxit hydrolaza I) và epoxit hydrolaza hòa tan (epoxit hydrolaza II) có thể được xem là các gen bản sao do chúng là hai enzym khác biệt, được tiến hóa đồng thời từ gen gốc chung, xúc tác các phản

ứng khác nhau và có chức năng khác biệt ở loài tương đồng. Các gen bản sao là các protein từ cùng một loài có độ tương đồng đáng kể về trình tự với nhau đề xuất rằng các gen này là tương đồng hoặc có mối liên hệ di truyền thông qua quá trình đồng tiến hóa từ gen gốc chung. Nhóm gồm họ protein bản sao bao gồm các đồng đẳng HipA, gen luciferaza, peptidaza và các protein khác. Chuyển vị gen không trực giao là gen không trực giao từ một loài có thể thay thế chức năng gen tham chiếu ở loài khác. Quá trình thay thế bao gồm, ví dụ, là có thể thực hiện chức năng hầu như tương tự hoặc giống nhau ở loài gốc so với chức năng tham chiếu ở loài khác nhau. Mặc dù nói chung, chuyển vị gen không trực giao sẽ được xác định khi có liên quan về mặt cấu trúc với gen mã hóa chức năng tham chiếu đã biết, tuy nhiên, các gen và sản phẩm gen tương ứng của chúng ít có lên quan về mặt cấu trúc nhưng tương đồng về chức năng vẫn nằm trong nghĩa của thuật ngữ này khi được sử dụng trong sáng chế. Các yêu cầu về độ tương đồng chức năng, ví dụ, ít nhất là độ tương đồng cấu trúc một chút ở vị trí hoạt động hoặc vùng liên kết của gen không trực giao so với gen mã hóa chức năng yêu cầu được thay thế. Do đó, gen không trực giao bao gồm, ví dụ, gen bản sao hoặc gen không có mối liên hệ di truyền.

Do đó, để nhận dạng và tạo ra vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế có khả năng sinh tổng hợp 4-HB, GBL và/hoặc BDO, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng với việc sử dụng nguyên lý và quy trình được đề xuất theo sáng chế cho loài cụ thể, việc xác định các biến đổi chuyển hóa có thể bao gồm việc xác định và đưa vào hoặc làm bất hoạt các gen trực giao. Trong vùng mà các gen bản sao và/hoặc các chuyển vị gen không trực giao có mặt ở vi sinh vật tham chiếu mà mã hóa enzym xúc tác phản ứng chuyển hóa tương đồng hoặc gần như tương đồng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể sử dụng các gen có liên quan về mặt tiến hóa này.

Các gen trực giao, gen bản sao và chuyển vị gen không trực giao có thể được xác định theo các phương pháp đã được biết đến rộng rãi bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, kiểm tra các trình tự axit nucleic hoặc axit amin đối với hai polypeptit sẽ xác định được độ tương đồng hoặc tương tự về trình tự giữa các trình tự được so sánh này. Dựa trên độ tương đồng này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định nếu độ tương đồng là đủ lớn để cho thấy rằng các protein này là có mối liên hệ di truyền thông qua quá trình tiến hóa từ gen gốc chung. Các thuật toán đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như Align, BLAST, Clustal W và các thuật toán khác so sánh và xác định độ tương đồng hoặc tương tự về

trình tự nguyên vẹn và cũng xác định sự có mặt hoặc tầm quan trọng của các khoảng trống ở trình tự mà có thể được ấn định bởi trọng số hoặc điểm số Các thuật toán trên cũng đã được biết đến trong lĩnh vực này và có thể sử dụng tương tự nhau để xác định độ tương đồng hoặc tương tự về trình tự nucleotit. Các thông số tương tự nhau đủ để xác định mối liên hệ được tính toán dựa trên các phương pháp đã biết để tính toán độ tương đồng thống kê, hoặc xác suất tìm ra mối liên hệ tương đồng ở polypeptit ngẫu nhiêu và tầm quan trọng của mối liên hệ này được xác định. Nếu muốn, quá trình so sánh trên máy tính của hai hoặc nhiều trình tự, cũng có thể được tối ưu hóa một cách trực quan bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các sản phẩm gen hoặc protein liên quan có thể được kỳ vọng để có độ tương đồng cao, ví dụ, nằm trong khoảng từ 25% đến 100% độ tương đồng trình tự. Các protein không có mối liên hệ di truyền có thể có độ tương đồng mà gần như là giống như được kỳ vọng để xuất hiện ngẫu nhiên, nếu cơ sở dữ liệu có kích thước đủ được quét (khoảng 5%). Các trình tự có độ tương đồng nằm trong khoảng từ 5% đến 24% có thể hoặc không thể đủ để kết luận rằng các trình tự được so sánh là có mối liên hệ di truyền. Phân tích thống kê bổ sung để xác định tầm quan trọng của các mối liên hệ này dựa trên kích thước của bộ dữ liệu có thể được thực hiện để xác định mối liên hệ của các trình tự này.

Ví dụ về các thông số để xác định mối liên hệ của hai hoặc nhiều trình tự bằng cách sử dụng thuật toán BLAST, ví dụ, có thể được trình bày dưới đây. Nói ngắn gọn, quá trình sắp xếp trình tự axit amin có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán BLASTP phiên bản 2.0.8 (05-01-1999) và các thông số sau: Nền: 0 BLOSUM62; độ mở khoảng trống: 11; độ giãn khoảng trống: 1; x_độ nghiêng: 50; kỳ vọng: 10,0; cỡ chữ: 3; bộ lọc: bật. Quá trình sắp xếp trình tự axit nucleic có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán BLASTN phiên bản 2.0.6 (16/09/1998) và các thông số sau: Độ tương hợp: 1; độ lệch: -2; độ mở khoảng trống: 5; độ giãn khoảng trống: 2; x_độ nghiêng: 50; kỳ vọng: 10,0; cỡ chữ: 11; bộ lọc: tắt. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết các cải biến nào có thể được tạo ra với các thông số nêu trên để hoặc làm tăng hoặc làm giảm độ chính xác của phép so sánh, ví dụ và xác định mối liên hệ của hai hoặc nhiều trình tự.

Sáng chế đề xuất vi sinh vật hoặc chất xúc tác sinh học từ vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic (4-HB), bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic

semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, glutamat: suxinic semialdehyt transaminaza, alpha-ketoglutarat decarboxylaza hoặc glutamat decarboxylaza, trong đó axit nucleic ngoại sinh này được biểu hiện với mức độ đủ để sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic (4-HB) monome. Enzym 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza cũng được sử dụng để chỉ 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza hoặc 4-HB dehydrogenaza. Enzym suxinyl-CoA syntetaza cũng được sử dụng để chỉ suxinyl-CoA syntaza hoặc suxinyl-CoA ligaza.

Sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật hoặc chất xúc tác sinh học từ vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic (4-HB), bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA hoặc alpha-ketoglutarat decarboxylaza, trong đó axit nucleic ngoại sinh này được biểu hiện với mức độ đủ để sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic (4-HB) monome.

Các vi sinh vật hoặc chất xúc tác sinh học từ vi khuẩn không có trong tự nhiên có thể bao gồm các vi sinh vật sử dụng các tập hợp phản ứng chuyển hóa để sinh tổng hợp các hợp chất của sáng chế. Các hợp chất được sinh tổng hợp này có thể được sản sinh ở bên trong tế bào và/hoặc tiết vào môi trường nuôi cấy. Ví dụ về hợp chất được sản sinh bởi các vi sinh vật không có trong tự nhiên này bao gồm, ví dụ, axit 4-hydroxybutanoic, 1,4-butandiol và γ-butyrolacton.

Theo một phương án, vi sinh vật không có trong tự nhiên được tạo ra để sản sinh 4-HB. Hợp chất này là hợp chất trung gian đầu vào hữu ích để tổng hợp nhóm hợp chất 1,4-butandiol. Các phản ứng sinh hóa để tổng hợp 4-HB từ suxinat, từ suxinat thông qua suxinyl-CoA hoặc từ α-ketoglutarat được thể hiện trong các giai đoạn từ 1 đến 8 trên Fig.1.

Được hiểu rằng, tổ hợp các enzym thích hợp bất kỳ tham gia vào quá trình sản sinh BDO có thể được sử dụng miễn là thu được quá trình biến đổi từ nguyên liệu ban đầu thành sản phẩm BDO. Do đó, được hiểu rằng các quá trình chuyển hóa bất kỳ được đề cập trong sáng chế có thể được sử dụng và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rõ bằng cách nào để chọn được các enzym thích hợp để thu được quá trình mong muốn, như được bộc lộ trong sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất vi sinh vật không có trong tự nhiên, bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để

sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO này bao gồm 4-aminobutyrat CoA transferaza, 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza, 4-aminobutyrat-CoA ligaza, 4-aminobutyryl-CoA oxidoreductaza (khử amin), 4-aminobutyryl-CoA transaminaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza (tham khảo ví dụ 7 bảng 17). Quá trình sản sinh BDO còn có thể bao gồm 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng tổ hợp các quá trình khác nhau có thể được sử dụng, như được bộc lộ trong sáng chế. Ví dụ, ở vi sinh vật không có trong tự nhiên, các axit nucleic có thể mã hóa 4-aminobutyrat CoA transferaza, 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-aminobutyrat-CoA ligaza; 4-aminobutyryl-CoA oxidoreductaza (khử amin) hoặc 4-aminobutyryl-CoA transaminaza; và 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza. Ví dụ khác về các tổ hợp được mô tả cụ thể dưới đây và có thể tìm thấy trên các hình vẽ Fig.8 đến Fig.13. Ví dụ, quá trình sản sinh BDO có thể còn bao gồm 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vi sinh vật không có trong tự nhiên, bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO này bao gồm 4-aminobutyrat CoA transferaza, 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza, 4-aminobutyrat-CoA ligaza, 4-aminobutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-aminobutyryl-CoA reductaza, 4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza, 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin) hoặc 4-aminobutan-1-ol transaminaza (tham khảo ví dụ 7 và bảng 18) và có thể còn bao gồm 1,4-butandiol dehydrogenaza. Ví dụ, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa 4-aminobutyrat CoA transferaza, 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-aminobutyrat-CoA ligaza; 4-aminobutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu); và 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin) hoặc 4-aminobutan-1-ol transaminaza. Ngoài ra, các axit nucleic có thể mã hóa. 4-aminobutyrat CoA transferaza, 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-aminobutyrat-CoA ligaza; 4-aminobutyryl-CoA reductaza; 4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza; và 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin) hoặc 4-aminobutan-1-ol transaminaza.

Sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật không có trong tự nhiên, bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym

tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO này bao gồm 4-aminobutyrat kinaza, 4-aminobutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa), 4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza, 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin), 4-aminobutan-1-ol transaminaza, axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic oxidoreductaza (khử amin), axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic transaminaza, 4-hydroxybutyryl-phosphat dehydrogenaza hoặc 4-hydroxybutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (tham khảo ví dụ 7 và bảng 19). Ví dụ, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa 4-aminobutyrat kinaza; 4-aminobutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa); 4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza; và 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin) hoặc 4-aminobutan-1-ol transaminaza. Ngoài ra, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa 4-aminobutyrat kinaza; axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic oxidoreductaza (khử amin) hoặc axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic transaminaza; 4-hydroxybutyryl-phosphat dehydrogenaza; và 4-hydroxybutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vi sinh vật không có trong tự nhiên, bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO này bao gồm alpha-ketoglutarat 5-kinaza, 2,5-dioxopentanoic semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa), axit 2,5-dioxopentanoic reductaza, alpha-ketoglutarat CoA transferaza, alpha-ketoglutaryl-CoA hydrolaza, alpha-ketoglutaryl-CoA ligaza, alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza, alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza hoặc axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl) (tham khảo ví dụ 8 và bảng 20). Quá trình sản sinh BDO có thể còn bao gồm 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza. Ví dụ, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa alpha-ketoglutarat 5-kinaza; 2,5-dioxopentanoic semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa); axit 2,5-dioxopentanoic reductaza; và axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza. Ngoài ra, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa alpha-ketoglutarat 5-kinaza; 2,5-dioxopentanoic semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa); axit 2,5-dioxopentanoic reductaza; và axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl). Theo cách khác, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa alpha-ketoglutarat CoA transferaza, alpha-ketoglutaryl-CoA hydrolaza hoặc alpha-ketoglutaryl-CoA ligaza; alpha-ketoglutaryl-CoA

reductaza, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza; và axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza. Theo một phương án khác, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa alpha-ketoglutarat CoA transferaza, alpha-ketoglutaryl-CoA hydrolaza hoặc alpha-ketoglutaryl-CoA ligaza; alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza và axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl). Theo cách khác, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa alpha-ketoglutarat CoA transferaza, alpha-ketoglutaryl-CoA hydrolaza hoặc alpha-ketoglutaryl-CoA ligaza; alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza (tạo thành rượu); và axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza. Theo một phương án khác nữa, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa alpha-ketoglutarat CoA transferaza, alpha-ketoglutaryl-CoA hydrolaza hoặc alpha-ketoglutaryl-CoA ligaza; alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza (tạo thành rượu); và axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl).

Sáng chế còn đề xuất vi sinh vật không có trong tự nhiên, bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO này bao gồm glutamat CoA transferaza, glutamyl-CoA hydrolaza, glutamyl-CoA ligaza, glutamat 5-kinaza, glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa), glutamyl-CoA reductaza, glutamat-5-semialdehyt reductaza, glutamyl-CoA reductaza (tạo thành rượu), axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza (khử amin), axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl) (tham khảo ví dụ 9 và bảng 21). Ví dụ, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa glutamat CoA transferaza, glutamyl-CoA hydrolaza hoặc glutamyl-CoA ligaza; glutamyl-CoA reductaza; glutamat-5-semialdehyt reductaza; axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza (khử amin) hoặc axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza; và axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza hoặc axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl). Theo cách khác, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa glutamat 5-kinaza; glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa); glutamat- 5-semialdehyt reductaza; axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza (khử amin) hoặc 2-amino-5 - hydroxypentanoic axit transaminaza; và axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza hoặc axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl). Theo một phương án khác nữa, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa glutamat CoA transferaza, glutamyl-CoA hydrolaza hoặc glutamyl-CoA ligaza; glutamyl-CoA reductaza (tạo thành

rượu); axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza (khử amin) hoặc 2-amino-5 - hydroxypentanoic axit transaminaza; và axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza hoặc axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl). Theo một phương án khác nữa, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa glutamat 5-kinaza; glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa); axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza (khử amin) hoặc axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza; và 5-hydroxy-2-oxopentanoic axit decarboxylaza hoặc 5-hydroxy-2-oxopentanoic axit dehydrogenaza (khử carboxyl).

Sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật không có trong tự nhiên, bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO này bao gồm 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza, vinylaxetyl-CoA Δ-isomeraza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza (tham khảo ví dụ 10 và bảng 22). Ví dụ, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza; 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza; vinylaxetyl-CoA Δ-isomeraza; và 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza.

Sáng chế còn đề cập đến vi sinh vật không có trong tự nhiên, bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO này bao gồm homoserin deaminaza, homoserin CoA transferaza, homoserin-CoA hydrolaza, homoserin-CoA ligaza, homoserin-CoA deaminaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA transferaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA ligaza, 4-hydroxybut-2-enoat reductaza, 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza, 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza hoặc 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA reductaza (tham khảo ví dụ 11 và bảng 23). Ví dụ, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa homoserin deaminaza; 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA transferaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA ligaza; 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA reductaza. Theo cách khác, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa homoserin CoA transferaza, homoserin-CoA hydrolaza hoặc homoserin-CoA ligaza; homoserin-CoA deaminaza; và 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA reductaza. Theo phương án khác nữa, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa homoserin deaminaza; 4-hydroxybut-2-enoat reductaza; và 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza, 4-hydroxybutyryl-

CoA hydrolaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza. Theo cách khác, các axit nucleic ngoại sinh này có thể mã hóa homoserin CoA transferaza, homoserin-CoA hydrolaza hoặc homoserin-CoA ligaza; homoserin-CoA deaminaza; và 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA reductaza.

Sáng chế còn đề cập đến vi sinh vật không có trong tự nhiên, bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO này bao gồm suxinyl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza, 4-hydroxybutanal dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (tham khảo bảng 15). Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO này có thể còn bao gồm suxinyl-CoA reductaza, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza, 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza, 4-hydroxybutyrat kinaza, phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vi sinh vật không có trong tự nhiên, bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO này bao gồm glutamat dehydrogenaza, 4-aminobutyrat oxidoreductaza (khử amin), 4-aminobutyrat transaminaza, glutamat decarboxylaza, 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza, 4-hydroxybutanal dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (tham khảo bảng 16). Quá trình sản sinh BDO này có thể còn bao gồm alpha-ketoglutarat decarboxylaza, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza, 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza, 4-hydroxybutyrat kinaza, phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza.

Các quá trình được mô tả nêu trên chỉ đơn thuần được lấy làm ví dụ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng chọn được các quá trình thích hợp từ các quá trình được bộc lộ trong sáng chế để thu được quá trình sản sinh BDO hoặc quá trình chuyển hóa thích hợp khác, như mong muốn.

Sáng chế đề xuất vi sinh vật được cải biến di truyền cho phép cải thiện quá trình sản sinh sản phẩm mong muốn như BDO bằng cách gia tăng sản phẩm chính hoặc giảm sản phẩm phụ không mong muốn. Như được bộc lộ trong sáng chế, sáng chế đề xuất vi

sinh vật không có trong tự nhiên, bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO (BDO) bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO. Theo một phương án, vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện suxinyl-CoA syntetaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 12). Ví dụ, suxinyl-CoA syntetaza có thể được mã hóa bởi các gen *sucCD* của *Escherichia coli*.

Theo một phương án khác, vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện alpha-ketoglutarat decarboxylaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 13). Ví dụ, alpha-ketoglutarat decarboxylaza có thể được mã hóa bởi gen *sucA* của *Mycobacterium bovis*. Theo một phương án khác nữa, vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện suxinat semialdehyt dehydrogenaza và 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza ngoại sinh và tùy ý 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 13). Ví dụ, suxinat semialdehyt dehydrogenaza (phụ thuộc-CoA), 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza và 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza có thể được mã hóa bởi các gen W83 của *Porphyromonas gingivalis*. Theo phương án bổ sung, vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 13). Ví dụ, butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza có thể được mã hóa bởi các gen *ptb* và *buk1* của *Clostridium axetobutilicum*.

Theo một phương án khác nữa, vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 13). Ví dụ, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza có thể được mã hóa bởi gen *ald* của *Clostridium beijerinckii*. Ngoài ra, theo phương án của sáng chế, vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện 4-hydroxybutanal reductaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 13). Ví dụ, 4-hydroxybutanal reductaza có thể được mã hóa bởi gen *adh1* của *Geobacillus thermoglucosidasius*. Theo một phương án khác, vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện các tiểu đơn vị của pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 14). Ví dụ, pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh có thể là NADH không nhạy. Tiểu đơn vị của pyruvat dehydrogenaza có thể được mã hóa bởi gen *lpdA* của *Klebsiella pneumonia*. Theo phương án cụ thể, các gen mã hóa tiểu đơn vị của pyruvat dehydrogenaza của vi sinh vật có thể chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mã hóa pyruvat format lyaza.

Theo một phương án khác nữa, vi sinh vật được cải biến di truyền để phá vỡ gen mã hóa hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí (tham khảo ví dụ 15). Ví dụ, việc phá

vỡ có thể là gen *arcA*. Vi sinh vật này có thể còn bao gồm phá vỡ gen mã hóa malat dehydrogenaza. Theo phương án khác nữa, vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện xitrat syntaza ngoại sinh không nhạy NADH (tham khảo ví dụ 15). Ví dụ, xitrat syntaza không nhạy NADH có thể được mã hóa bởi gen *gltA*, như thể đột biến R163L của gen *gltA*. Theo một phương án khác nữa, vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện phosphoenolpyruvat carboxykinaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 16). Ví dụ, phosphoenolpyruvat carboxykinaza có thể được mã hóa bởi gen mã hóa cho phosphoenolpyruvat carboxykinaza của *Haemophilus influenza*.

Được hiểu rằng số lượng cải biến di truyền bất kỳ, như được bộc lộ trong sáng chế, có thể được sử dụng độc lập hoặc theo tổ hợp khác nhau của một hoặc nhiều cải biến di truyền được bộc lộ trong sáng chế để làm tăng quá trình sản sinh BDO ở vi sinh vật sản sinh BDO. Theo phương án cụ thể, vi sinh vật có thể được cải biến di truyền để liên hợp bất kỳ và đến tất cả các cải biến di truyền mà dẫn đến làm tăng quá trình sản sinh BDO. Theo phương án cụ thể, vi sinh vật có quá trình sản sinh BDO có thể được cải biến di truyền để biểu hiện suxinyl-CoA syntetaza ngoại sinh; alpha-ketoglutarat decarboxylaza ngoại sinh; suxinat semialdehyt dehydrogenaza và 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza ngoại sinh và tùy ý là 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza; butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza ngoại sinh; 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza ngoại sinh; và 4-hydroxybutanal reductaza ngoại sinh; pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh; để phá vỡ gen mã hóa hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí; để biểu hiện xitrat syntaza không nhạy NADH; và để biểu hiện phosphoenolpyruvat carboxykinaza ngoại sinh. Các chủng để cải thiện quá trình sản sinh được mô tả trong các ví dụ 12-19. Do đó, được hiểu rằng, ngoài các cải biến được mô tả nêu trên, các chủng này có thể tùy ý bao gồm các cải biến khác được bộc lộ trong sáng chế. Các cải biến này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, loại bỏ lactat dehydrogenaza nội sinh (*ldhA*), rượu dehydrogenaza (*adhE*) và/hoặc pyruvat format lyaza (*pflB*) (tham khảo các ví dụ 12-19 và bảng 28).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vi sinh vật trong đó một hoặc nhiều gen mã hóa các enzym được biểu hiện ngoại sinh được liên hợp vào ổ gen fimD của sinh vật chủ (tham khảo ví dụ 17). Ví dụ, một hoặc nhiều gen mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO có thể được liên hợp vào ổ gen fimD để làm tăng quá trình sản sinh BDO. Sáng chế còn đề xuất vi sinh vật biểu hiện hệ thống hấp thu sucroza không phosphotransferaza mà làm tăng quá trình sản sinh BDO.

Mặc dù, các vi sinh vật được cải biến di truyền được bộc lộ trong sáng chế được minh họa bằng các vi sinh vật chứa các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO cụ thể, được hiểu rằng các cải biến này có thể được liên hợp vào vi sinh vật bất kỳ có quá trình sản sinh BDO thích hợp để cải thiện quá trình sản sinh khi có mặt các cải biến di truyền này. Do đó, các vi sinh vật theo sáng chế có thể có quá trình sản sinh BDO bất kỳ được bộc lộ trong sáng chế. Ví dụ, quá trình sản sinh BDO có thể bao gồm 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, 4-hydroxybutyrat:CoA transferaza, 4-butyrat kinaza, phosphotransbutyrylaza, alpha-ketoglutarat decarboxylaza, aldehyt dehydrogenaza, rượu dehydrogenaza hoặc aldehyt/rượu dehydrogenaza (tham khảo Fig.1). Theo cách khác, quá trình sản sinh BDO có thể bao gồm 4-aminobutyrat CoA transferaza, 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza, 4-aminobutyrat-CoA ligaza, 4-aminobutyryl-CoA oxidoreductaza (khử amin), 4-aminobutyryl-CoA transaminaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza (tham khảo bảng 17). Quá trình sản sinh BDO này có thể còn bao gồm 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza

Ngoài ra, quá trình sản sinh BDO có thể bao gồm 4-aminobutyrat CoA transferaza, 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza, 4-aminobutyrat-CoA ligaza, 4-aminobutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-aminobutyryl-CoA reductaza, 4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza, 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin) hoặc 4-aminobutan-1-ol transaminaza (tham khảo bảng 18). Ngoài ra, quá trình sản sinh BDO có thể bao gồm 4-aminobutyrat kinaza, 4-aminobutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa), 4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza, 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin), 4-aminobutan-1-ol transaminaza, axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic oxidoreductaza (khử amin), axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic transaminaza, 4-hydroxybutyryl-phosphat dehydrogenaza hoặc 4-hydroxybutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (tham khảo bảng 19). Quá trình sản sinh BDO này có thể còn bao gồm 1,4-butandiol dehydrogenaza.

Quá trình sản sinh BDO có thể còn bao gồm alpha-ketoglutarat 5-kinaza, 2,5-dioxopentanoic semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa), axit 2,5-dioxopentanoic reductaza, alpha-ketoglutarat CoA transferaza, alpha-ketoglutaryl-CoA hydrolaza, alpha-ketoglutaryl-CoA ligaza, alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza, axit 5-hydroxy-2-

oxopentanoic dehydrogenaza, alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza hoặc axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl) (tham khảo bảng 20). Quá trình sản sinh BDO này có thể còn bao gồm 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza. Ngoài ra, quá trình sản sinh BDO có thể bao gồm glutamat CoA transferaza, glutamyl-CoA hydrolaza, glutamyl-CoA ligaza, glutamat 5-kinaza, glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa), glutamyl-CoA reductaza, glutamat-5-semialdehyt reductaza, glutamyl-CoA reductaza (tạo thành rượu), axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza (khử amin), axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl) (tham khảo bảng 21). Quá trình sản sinh BDO này có thể còn bao gồm 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza.

Ngoài ra, quá trình sản sinh BDO có thể bao gồm 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza, vinylaxetyl-CoA Δ-isomeraza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza (tham khảo bảng 22). Ngoài ra, quá trình sản sinh BDO có thể bao gồm homoserin deaminaza, homoserin CoA transferaza, homoserin-CoA hydrolaza, homoserin-CoA ligaza, homoserin -CoA deaminaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA transferaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA ligaza, 4-hydroxybut-2-enoat reductaza, 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza, 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza hoặc 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA reductaza (tham khảo bảng 23). Quá trình sản sinh BDO này có thể còn bao gồm 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza.

Quá trình sản sinh BDO có thể tùy ý bao gồm suxinyl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (tham khảo bảng 15). Quá trình sản sinh BDO này có thể còn bao gồm suxinyl-CoA reductaza, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza, 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza, 4-hydroxybutyrat kinaza, phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza. Ngoài ra, quá trình sản sinh BDO có thể bao gồm glutamat dehydrogenaza, 4-aminobutyrat oxidoreductaza (khử amin), 4-

aminobutyrat transaminaza, glutamat decarboxylaza, 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (tham khảo bảng 16). Quá trình sản sinh BDO này có thể còn bao gồm alpha-ketoglutarat decarboxylaza, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza, 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza, 4-hydroxybutyrat kinaza, phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza.

Sáng chế được mô tả ở đây có tham chiếu chung đến phản ứng chuyển hóa, chất phản ứng hoặc sản phẩm của chúng, hoặc có tham chiếu cụ thể tới một hoặc nhiều axit nucleic hoặc gen mã hóa cho enzym liên quan đến hoặc xúc tác cho phản ứng, chất phản ứng hoặc sản phẩm chuyển hóa tham chiếu. Trừ khi có quy định khác theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng tham chiếu đến một phản ứng còn thiết lập tham chiếu đến các chất phản ứng và sản phẩm của phản ứng đó. Tương tự, trừ khi có quy định khác theo sáng chế, tham chiếu đến một chất phản ứng hoặc sản phẩm cũng tham chiếu đến phản ứng và tham chiếu đến thành phần chuyển hóa bất kỳ cũng tham chiếu đến gen hoặc các gen mã hóa cho các enzyme xúc tác phản ứng, chất phản ứng hoặc sản phẩm tham chiếu. Tương tự, dựa trên các lĩnh vực hóa sinh, enzym và hệ gen chuyển hóa đã được biết đến rộng rãi, việc tham chiếu trong bản mô tả đến gen hoặc axit nucleic mã hóa cũng thiết lập việc tham chiếu đến enzyme được mã hóa tương ứng và phản ứng mà enzym này xúc tác cũng như các chất phản ứng và sản phẩm của phản ứng đó.

Quá trình sản sinh 4-HB thông qua các mô hình sinh tổng hợp sử dụng các vi sinh vật theo sáng chế đặc biệt hữu ích do vi sinh vật này có thể sản 4-HB monome. Các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế và quá trình sinh tổng hợp 4-HB và nhóm hợp chất BOD của chúng cũng đặc biệt hữu ích do sản phẩm 4-HB có thể (1) được tiết ra; (2) có thể trách được việc tạo dẫn xuất bất kỳ như Coenzym A; (3) tránh thay đổi nhiệt động trong quá trình sinh tổng hợp; (4) cho phép sinh tổng hợp trực tiếp BDO và (5) cho phép biến đổi hóa học một cách tự nhiên từ 4-HB thành γ-butyrolacton (GBL) trong môi trường pH axit. Đặc tính sau cùng này cũng đặc biệt hữu ích để tổng hợp hóa học hoặc sinh tổng hợp hiệu quả nhóm hợp chất BOD ví dụ như 1,4-butandiol và/hoặc tetrahydrofuran (THF).

Các vi sinh vật thường không có khả năng sinh tổng hợp 4-HB và do đó, hợp chất bất kỳ được bộc lộ trong sáng chế thuộc nhóm hợp chất 1,4-butandiol hoặc được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thuộc nhóm hợp chất 1,4-butandiol. Ngoài ra, sinh vật có tất cả các khả năng enzym chuyển hóa cần thiết không được biết đến để sinh tổng hợp 4-HB từ các enzym đã được mô tả và các quá trình sinh hóa được minh họa trong sáng chế. Thay vào đó, có thể ngoại trừ một số vi sinh vật kỵ khí cũng được mô tả dưới đây, các vi sinh vật có khả năng enzym sử dụng 4-HB làm cơ chất để tổng hợp, ví dụ, suxinat. Ngược lại, các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể tổng hợp 4-HB hoặc BDO dưới dạng sản phẩm. Như được mô tả nêu trên, quá trình sinh tổng hợp 4-HB ở dạng monome không chỉ đặc biệt hữu ích trong quá trình tổng hợp hóa học nhóm hợp chất BOD, mà quá trình này còn cho phép sinh tổng hợp tiếp nhóm hợp chất BOD và thay thế hoàn toàn các quá trình tổng hợp hóa học.

Sáng chế đề xuất các vi sinh vật không có trong tự nhiên có thể sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO được tạo ra bằng cách đảm bảo chắc chắn rằng vi sinh vật chủ có khả năng chức năng cho quá trình tổng hợp sinh hóa hoàn toàn ít nhất một quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO của sáng chế. Đảm bảo chắc chắn rằng, ít nhất một quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO cần thiết tạo ra khả năng sinh tổng hợp 4-HB cho vi sinh vật chủ.

Năm quá trình sinh tổng hợp 4-HB được minh họa trong sáng chế và thể hiện cho mục đích minh họa trên Fig.1. Các quá trình sản sinh 4-HB và BDO khác được mô tả trên Fig.8-13. Một quá trình sinh tổng hợp 4-HB bao gồm quá trình sinh tổng hợp 4-HB từ suxinat (quá trình suxinat). Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB này bao gồm suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA và 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza. Trong quá trình này, suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA xúc tác phản ứng ngược với chiều mũi tên được thể hiện trên Fig.1. Quá trình sinh tổng hợp 4-HB khác bao gồm quá trình sinh tổng hợp từ suxinat thông qua suxinyl-CoA (quá trình suxinyl-CoA). Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB này bao gồm suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA và 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza. Ba quá trình sinh tổng hợp 4-HB khác bao gồm quá trình sinh tổng hợp 4-HB từ α-ketoglutarat (quá trình α-ketoglutarat). Do đó, quá trình sinh tổng hợp 4-HB thứ ba là quá trình sinh tổng hợp suxinic semialdehyt thông qua glutamat:suxinic semialdehyt transaminaza, glutamat decarboxylaza và 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza. Quá trình sinh tổng hợp 4-HB thứ tư cũng bao gồm quá trình sinh tổng

hợp 4-HB từ α-ketoglutarat, nhưng sử dụng α-ketoglutarat decarboxylaza để xúc tác quá trình sinh tổng hợp suxinic semialdehyt. Enzym 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza xúc tác quá trình biến đổi suxinic semialdehyt thành 4-HB. Quá trình sinh tổng hợp 4-HB thứ năm bao gồm quá trình sinh tổng hợp từ α-ketoglutarat thông qua suxinyl-CoA và sử dụng α-ketoglutarat dehydrogenaza để tổng hợp suxinyl-CoA, tham gia vào quá trình suxinyl-CoA được mô tả nêu trên. Đối với mỗi quá trình sinh tổng hợp 4-HB này, các cơ chất, thuốc thử và sản phẩm của các quá trình này cũng được mô tả chi tiết dưới đây trong các ví dụ. Như được mô tả trong sáng chế, 4-HB có thể còn được biến đổi sinh tổng hợp thành BDO bằng cách đưa vào các enzym thích hợp để tổng hợp BDO (tham khảo ví dụ). Do đó, được hiểu rằng quá trình sản sinh 4-HB có thể được sử dụng với các enzym để biến đổi 4-HB thành BDO để tạo ra quá trình sản sinh BDO.

Các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách chèn thêm các axit nucleic có thể biểu hiện mã hóa một hoặc nhiều enzym tham gia vào một hoặc nhiều quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO. Tùy thuộc vào vi sinh vật chủ được lựa chọn cho quá trình sinh tổng hợp, các axit nucleic cho một số hoặc tất cả các quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO cụ thể có thể được biểu hiện. Ví dụ, nếu vi sinh vật chủ được lựa chọn không có một hoặc nhiều enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp mong muốn, ví dụ, quá trình từ suxinat thành 4-HB, thì các axit nucleic có thể biểu hiện cho các enzym bị thiếu này, ví dụ, cả suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA và 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza trong ví dụ này, được chèn vào vi sinh vật chủ để sau đó biểu hiện ngoại sinh. Theo cách khác, nếu vi sinh vật chủ được chọn thể hiện quá trình biểu hiện nội sinh của một số enzym tham gia vào quá trình sản sinh, nhưng thiếu các enzym khác, thì nucleic mã hóa cho các enzym bị thiếu này là cần thiết để thu được quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO. Ví dụ, nếu vi sinh vật chủ biểu hiện suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA nội sinh, nhưng không có 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, thì nucleic mã hóa cho enzym này là cần thiết để thu được quá trình sinh tổng hợp 4-HB. Do đó, vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách đưa thêm các hoạt tính enzym hoặc protein ngoại sinh để thu được quá trình sinh tổng hợp mong muốn hoặc quá trình sinh tổng hợp mong muốn có thể thu được bằng cách đưa vào một hoặc nhiều hoạt tính enzym hoặc protein ngoại sinh, cùng với một hoặc nhiều enzym hoặc protein ngoại sinh sản sinh hợp chất mong muốn như 4-HB hoặc BDO.

Theo phương thức tương tự, trong đó quá trình sinh tổng hợp 4-HB được lựa chọn để diễn ra thông qua quá trình từ suxinat thành suxinyl-CoA (quá trình suxinyl-CoA), các axit nucleic mã hóa cho sự thiếu hụt các enzym suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA và/hoặc 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza ở vật chủ được biểu hiện ngoại sinh ở vật chủ tiếp nhận. Việc lựa chọn quá trình sinh tổng hợp 4-HB thông qua quá trình từ α-ketoglutarat thành suxinic semialdehyt (quá trình α-ketoglutarat) có thể sử dụng sự biểu hiện ngoại sinh cho sự thiếu hụt một hoặc nhiều enzym ở vật chủ như glutamat: suxinic semialdehyt transaminaza, glutamat decarboxylaza và/hoặc 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza hoặc α-ketoglutarat decarboxylaza và 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được các enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO, như được bộc lộ trong sáng chế.

Tùy thuộc vào các thành phần tham gia vào quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO của vi sinh vật chủ được chọn, các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế sẽ bao gồm ít nhất một axit nuclecic mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO được biểu hiện ngoại sinh và tất cả các axit nucleic mã hóa cho một hoặc nhiều quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO. Ví dụ, quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO có thể được thiết lập ở vi sinh vật chủ thiếu hụt enzym hoặc protein tham gia vào quá trình sản sinh mong muốn thông qua sự biểu hiện ngoại sinh của axit nucleic mã hóa tương ứng. Ở vi sinh vật chủ thiếu hụt tất cả các enzym hoặc protein tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO, sự biểu hiện ngoại sinh của tất cả các enzym hoặc protein tham gia vào quá trình này có thể được bao gồm, mặc dù được hiểu rằng tất cả các enzym hoặc protein tham gia vào quá trình này có thể được biểu hiện thậm chí nếu sinh vật chủ chứa ít nhất một trong số các enzym hoặc protein tham gia vào quá trình này. Ví dụ, quá trình sản sinh 4-HB có thể được tạo ra toàn bộ từ năm quá trình sản sinh nêu trên ở vi sinh vật chủ thiếu hụt 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza thông qua sự biểu hiện ngoại sinh của axit nucleic mã hóa 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza. Ngược lại, quá trình sản sinh 4-HB có thể được tạo ra toàn bộ từ năm quá trình sản sinh nêu trên ở vi sinh vật chủ thiếu hụt toàn bộ tám enzym thông qua sự biểu hiện ngoại sinh của toàn bộ tám enzym bao gồm suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, glutamat: suxinic semialdehyt transaminaza, glutamat decarboxylaza, alpha-ketoglutarat decarboxylaza, alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza.

Dựa trên các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng số lượng các axit nucleic mã hóa để đưa vào dạng có thể biểu hiện, ít nhất sẽ tương ứng với sự thiếu hụt của các enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO của vi sinh vật chủ được chọn. Do đó, vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám hoặc tất cả các axit nucleic mã hóa các enzym được bộc lộ trong sáng chế tạo ra một hoặc nhiều quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO. Theo một số phương án, các vi sinh vật không có trong tự nhiên cũng có thể chứa các cải biến di truyền khác mà tạo điều kiện thuận lợi hoặc tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO hoặc tạo ra các chức năng hữu ích khác cho vi sinh vật chủ. Một chức năng khác như vậy có thể bao gồm, ví dụ, làm tăng quá trình sinh tổng hợp một hoặc nhiều tiền chất tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB như suxinat, suxinyl-CoA, α-ketoglutarat, 4-aminobutyrat, glutamat, axetoaxetyl-CoA và/hoặc homoserin.

Nói chung, vi sinh vật chủ được chọn sao cho sản sinh tiền chất của quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO, hoặc dưới dạng phân tử được sản sinh một cách tự nhiên hoặc sản phẩm được thiết kế mà tạo ra quá trình sản sinh *de novo* tiền chất mong muốn hoặc làm tăng quá trình sản sinh tiền chất được tổng hợp một cách tự nhiên bởi vi sinh vật chủ. Ví dụ, suxinyl-CoA, alpha-ketoglutarat, 4-aminobutyrat, glutamat, axetoaxetyl-CoA và homoserin được sản sinh một cách tự nhiên ở vi sinh vật chủ như *E. coli*. Vi sinh vật chủ có thể được thiết kế để làm tăng quá trình sản sinh tiền chất, như được bộc lộ trong sáng chế. Ngoài ra, vi sinh vật đã được thiết kế để sản sinh tiền chất mong muốn có thể được sử dụng làm vi sinh vật chủ và còn được thiết kế hơn nữa để biểu hiện các enzym hoặc protein của quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO.

Theo một số phương án, vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế được tạo ra từ vi sinh vật chủ có khả năng enzym để tổng hợp 4-HB hoặc BDO. Theo phương án cụ thể này, vi sinh vật theo sáng chế có thể hữu ích để làm tăng quá trình tổng hợp hoặc tích lũy sản phẩm của quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO để, ví dụ, điều chỉnh các phản ứng của quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO theo hướng sản sinh ra 4-HB hoặc BDO. Việc tăng quá trình tổng hợp hoặc tích lũy các hợp chất này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, biểu hiện quá mức các axit nucleic mã hóa một hoặc nhiều enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO được bộc lộ trong sáng chế. Sự biểu hiện quá mức của enzym hoặc các enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO có thể xuất hiện, ví dụ,

thông qua sự biểu hiện ngoại sinh của gen hoặc các gen nội sinh hoặc thông qua sự biểu hiện ngoại sinh của gen hoặc các gen không tương đồng. Do đó, vi sinh vật có trong tự nhiên có thể dễ dàng được tạo ra để làm các vi sinh vật sinh sản sinh 4-HB hoặc BDO không có trong tự nhiên theo sáng chế thông qua việc biểu hiện quá mức một, hai, ba, bốn, năm, sáu và đến toàn bộ các axit nucleic mã hóa các enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO. Ngoài ra, vi sinh vật không có trong tự nhiên có thể được tạo ra bằng cách tạo các đột biến trên gen nội sinh mà dẫn đến làm tăng hoạt tính của enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO.

Theo các phương án đặc biệt hữu ích, sự biểu hiện ngoại sinh của các axit nucleic mã hóa được sử dụng. Sự biểu hiện ngoại sinh tạo ra khả năng điều chỉnh tùy ý sự biểu hiện và/hoặc các yếu tố điều hòa cho vi sinh vật chủ và sử dụng để thu được mức độ biểu hiện mong muốn được kiểm soát bởi người sử dụng. Tuy nhiên, theo các phương án khác sự biểu hiện nội sinh cũng có thể được sử dụng như bằng cách loại bỏ yếu tố tác động điều hòa âm tính hoặc gây cảm ứng trình tự khởi đầu của gen khi được liên kết với trình tự khởi đầu có thể cảm ứng hoặc yếu tố điều hòa khác. Do đó, gen nội sinh có trình tự khởi đầu có thể cảm ứng có trong tự nhiên có thể được điều hòa lên bằng cách tạo ra tác nhân cảm ứng hoặc vùng điều hòa thích hợp của gen nội sinh có thể được thiết kế để liên hợp yếu tố điều hòa có thể cảm ứng, do đó cho phép điều hòa tăng biểu hiện của gen nội sinh tại thời điểm mong muốn. Tương tự, trình tự khởi đầu có thể cảm ứng có thể được bao gồm dưới dạng yếu tố điều hòa đối với gen ngoại sinh được chèn vào vi sinh vật không có trong tự nhiên (tham khảo các ví dụ).

"Ngoại sinh" khi được sử dụng trong sáng chế nhằm chỉ phân tử tham chiếu hoặc hoạt tính tham chiếu được đưa vào vi sinh vật chủ. Phân tử này có thể được đưa vào, ví dụ, bằng cách chèn thêm axit nucleic mã hóa vào vật chất di truyền của vi sinh vật chủ ví dụ bằng cách liên hợp vào nhiễm sắc thể hoặc vật chất di truyền không thuộc nhiễm sắc thể như plasmit của vi sinh vật chủ. Do đó, thuật ngữ này khi được sử dụng để chỉ sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa tức là để chỉ sự chèn thêm axit nucleic mã hóa dưới dạng biểu hiện được vào vi sinh vật. Khi được sử dụng để chỉ hoạt tính sinh tổng hợp, thuật ngữ này chỉ hoạt tính được đưa vào vi sinh vật chủ tham chiếu. Ví dụ, các nguồn có thể là axit nucleic mã hóa tương đồng hoặc không tương đồng biểu hiện hoạt tính tham chiếu sau khi được đưa vào vi sinh vật chủ. Do đó, thuật ngữ "ngoại sinh" chỉ phân tử hoặc hoạt tính tham chiếu có trong sinh vật chủ. Tương tự, thuật ngữ này khi được sử dụng để chỉ sự biểu

hiện của axit nucleic mã hóa tức là chỉ sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa có trong vi sinh vật. Thuật ngữ "không tương đồng" chỉ phân tử hoặc hoạt tính thu được từ nguồn khác với loài tham chiếu, trong khi đó "tương đồng" chỉ phân tử hoặc hoạt tính thu được từ vi sinh vật chủ. Do đó, sự biểu hiện ngoại sinh của axit nucleic mã hóa theo sáng chế có thể sử dụng một trong hai hoặc cả hai axit nucleic mã hóa tương đồng hoặc không tương đồng.

Nguồn các axit nucleic mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO có thể bao gồm, ví dụ, loài bất kỳ ở đó sản phẩm gen được mã hóa có thể xúc tác phản ứng tham chiếu. Loài này bao gồm cả sinh vật tiền nhân và sinh vật nhân thật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vi khuẩn, bao gồm cổ khuẩn và vi khuẩn thực và sinh vật nhân thật, bao gồm nấm men, thực vật, côn trùng, động vật và động vật có vú, bao gồm người. Ví dụ về các loài để làm nguồn như vậy bao gồm, ví dụ, *Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces kluyveri, Clostridium kluyveri, Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, Clostridium saccharoperbutylacetonicum, Clostridium perfringens , Clostridium difficile, Clostridium botulinum, Clostridium tyrobutyricum, Clostridium tetanomorphum, Clostridium tetani, Clostridium propionicum, Clostridium aminobutyricum, Clostridium subterminale, Clostridium sticklandii, Ralstonia eutropha, Mycobacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis, Porphyromonas gingivalis, Arabidopsis thaliana, Thermus thermophilus,* loài *Pseudomonas*, bao gồm *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas fluorescens, Homo sapiens, Oryctolagus cuniculus, Rhodobacter spaeroides, Thermoanaerobacter brockii, Metallosphaera sedula, Leuconostoc mesenteroides, Cloflexus aurantiacus, Roseiflexus castenholzii, Erythrobacter, Simmondsia chinensis*, loài *Acinetobacter*, bao gồm *Acinetobacter calcoaxeticus* và *Acinetobacter baylyi, Porphyromonas gingivalis, Sulfolobus tokodaii, Sulfolobus solfataricus, Sulfolobus axitocaldarius, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus brevis, Bacillus pumilus, Rattus norvegicus, Klebsiella pneumonia, Klebsiella oxytoca, Euglena gracilis, Treponema denticola, Moorella thermoaxetica, Thermotoga maritima, Halobacterium salinarum, Geobacillus stearothermophilus, Aeropyrum pernix, Sus scrofa, Caenorhabditis elegans, Corynebacterium glutamicum, Axitaminococcus fermentans, Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum, Streptococcus thermophilus*, *Enterobacter aerogens, Candida, Aspergillus terreus, Pedicoccus pentosaceus, Zymomonas mobilus, Acetobacter pasteurians, Kluyveromyces lactis, Eubacterium barkeri, Bacteroides capillosus,*

Anaerotruncus colihominis, Natranaerobius thermophilusm, Campylobacter jejuni, Haemophilus influenzae, Serratia marcescens, Citrobacter amalonaticus, Myxococcus xanthus, Fusobacterium nuleatum, Penicillium chrysogenum marine gama proteobacterium, vi khuẩn sản sinh butyrat và loài khác được bộc lộ trong sáng chế (tham khảo các ví dụ). Ví dụ, các vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO được minh họa trong sáng chế tham chiếu với các sinh vật chủ là *E.coli* và nấm men. Tuy nhiên, với trình tự bộ gen hoàn chỉnh có sẵn từ hơn 550 loài hiện tại (với hơn một nửa trong số đó sẵn có từ các cơ sở dữ liệu công khai như NCBI), bao gồm 395 bộ gen vi sinh vật và nhiều bộ gen của nấm men, nấm, thực vật và động vật có vú, sự tương đồng của các gen mã hóa hoạt tính sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO mong muốn cho một hoặc nhiều gen ở loài tương đồng hoặc không tương đồng, bao gồm ví dụ, các gen tương đồng, gen trực giao, gen bản sao và gen không tiến hóa thẳng thay thế các gen đã biết và hoán đổi các gây đột biến giữa các sinh vật là thường xuyên và đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Ngoài ra, các đột biến chuyển hóa tạo ra khả năng sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO và các hợp chất khác được mô tả theo sáng chế tham chiếu với sinh vật cụ thể như *E.coli* hoặc nấm men có thể dễ dàng được ứng dụng cho các vi sinh vật khác, bao gồm các sinh vật tiền nhân và sinh vật nhân thật giống nhau. Dựa trên các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng quá trình gây đột biến chuyển hóa được minh họa ở một vi sinh vật này có thể được sử dụng tương tự cho các vi sinh vật khác.

Trong một số trường hợp, như khi quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO thay thế tồn tại ở loài không tương đồng, quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO có thể được tạo ra ở loài chủ ví dụ, bằng cách biểu hiện ngoại sinh các gen bản sao từ loài không tương đồng mà xúc tác phản ứng chuyển hóa tương tự, nhưng không tương đồng để thay thế phản ứng tham chiếu. Bởi vì có sự khác biệt nhất định giữa các hệ thống chuyển hóa ở các sinh vật khác nhau người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng thực tế là việc sử dụng các gen giữa các sinh vật khác nhau có thể khác nhau. Tuy nhiên, dựa trên các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ hiểu rằng nguyên lý và phương pháp theo sáng chế có thể được ứng dụng cho tất cả các vi sinh vật sử dụng các đột biến chuyển hóa tương tự với các đột biến được minh họa trong sáng chế để tạo ra vi sinh vật ở loài với mục tiêu là sẽ sinh tổng hợp 4-HB, như 4-HB monome hoặc BDO.

Các vi sinh vật chủ có thể được chọn từ và tạo ra các vi sinh vật không có trong tự nhiên, ví dụ, vi khuẩn, nấm men, nấm hoặc nhiều vi sinh vật bất kỳ khác có khả năng ứng dụng cho các quy trình lên men. Vi khuẩn tiêu biểu bao gồm loài được chọn từ *Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Anaerobiospirillum suxciniciproducens, Actinobacillus succinogens, Mannheimia suxciniciproducens, Rhizobium etli, Bacillus subtilis, Corynebacterium glutamicum, Gluconobacter oxydans, Zymomonas mobilis, Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum, Streptomyces coelicolor, Clostridium acetobutylicum, Pseudomonas fluorescens* và *Pseudomonas putida*. Các nấm men hoặc nấm tiêu biểu bao gồm loài được chọn từ *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Aspergillus terreus, Aspergillus niger* và *Pichiapastoris*. *E. coli* là vi sinh vật chủ đặc biệt hữu ích do *E.coli* là vi sinh vật đặc trưng thích hợp để thiết kế di truyền. Vi sinh vật chủ đặc biệt hữu ích khác bao gồm nấm men như *Saccharomyces cerevisiae.*

Phương pháp thiết kế và thử nghiệm mức độ biểu hiện của vi sinh vật chủ sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO không có trong tự nhiên có thể được thực hiện, ví dụ, theo các phương pháp phát hiện và tái tổ hợp đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Các phương pháp này có thể được tìm thấy như được mô tả trong, ví dụ, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); Ausubel et al., *Current Protocols inmolecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999). 4-HB và GBL có thể được phân tách, ví dụ, bằng phương pháp HPLC sử dụng cột Spherisorb 5 ODS1 và pha động chứa 70% dung dịch đệm phosphat 10mM (pH=7) và 30% metanol và được phát hiện bằng bộ dò UV ở bước sóng 215nm (Hennessy et al. 2004, J. Forensic Sci. 46(6): 1-9). Hợp chất BDO được phát hiện bằng phương pháp sắc ký khí hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và bộ dò khúc xạ sử dụng cột Aminex HPX-87H và pha động chứa axit sulfuric 0,5mM (Gonzalez-Pajuelo et al., *Met. Eng.* 7:329-336 (2005)).

Các trình tự axit nucleic ngoại sinh tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO có thể được chèn một cách ổn định hoặc tạm thời vào tế bào chủ sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp tiếp hợp, tạo xung điện, biến nạp hóa học, tải nạp, chuyển nạp và biến nạp bằng siêu âm. Đối với quá trình biểu hiện ngoại sinh ở E.coli hoặc các tế bào tiền nhân khác, một số trình tự axit nucleic ở các gen hoặc ADN bổ sung là các axit nucleic của sinh

vật nhân thật có thể mã hóa các tín hiệu hướng đích như tín hiệu hướng đích kết thúc bằng đầu tận cùng N ở ty lạp thể hoặc tín hiệu hướng đích khác, có thể được loại bỏ trước khi biến nạp vào tế bào chủ tiền nhân, nếu muốn. Ví dụ, loại bỏ trình tự dẫn đầu ty lạp thể dẫn đến làm tăng quá trình biểu hiện ở chủng *E.coli* (Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005)). Đối với quá trình biểu hiện ngoại sinh ở nấm men hoặc các tế bào nhân thật khác, các gen có thể được biểu hiện ở bào tương mà không bổ sung trình tự dẫn đầu hoặc có thể được hướng đích tới ty lạp thể hoặc các vi cơ quan khác hoặc với hướng đích để tiết ra, bằng cách bổ sung trình tự hướng đích thích hợp như tín hiệu tiết ra hoặc hướng đích ty lạp thể thích hợp cho các tế bào chủ. Do đó, được hiểu rằng các biến đổi thích hợp đối với trình tự axit nucleic để loại bỏ hoặc bao gồm trình tự hướng đích có thể được liên hợp vào trình tự axit nucleic ngoại sinh để tạo ra các đặc tính mong muốn. Ngoài ra, các gen có thể được trải qua quá trình tối ưu hóa bộ ba mã hóa bằng các kỹ thuật đã được biến đến rộng rãi trong lĩnh vực này để thu được sự biểu hiện của các protein được tối ưu hóa.

Vectơ hoặc các vectơ biểu hiện có thể được thiết kế để chứa một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa quá trình sinh tổng hợp 4-HB và/hoặc BDO as được minh họa trong sáng chế có thể được liên kết hoạt động với các trình tự kiểm soát biểu hiện chức năng ở sinh vật chủ. Các vectơ biểu hiện có thể sử dụng ở các vi sinh vật chủ theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các plasmit, vectơ thực khuẩn thể, vectơ virut, thể bổ sung và nhiễm sắc thể nhân tạo, bao gồm các vectơ và trình tự hoặc gen chỉ thị chọn lọc có thể liên hợp ổn định vào nhiễm sắc thể của sinh vật chủ. Ngoài ra, các vectơ biểu hiện có thể bao gồm một hoặc nhiều gen chỉ thị chọn lọc được và trình tự kiểm soát biểu hiện thích hợp. Các gen chỉ thị có thể chọn lọc cũng có thể được bao gồm, ví dụ, gen kháng kháng sinh hoặc độc tố, các thiếu hụt dinh dưỡng thụ động bổ sung hoặc bổ sung các chất dinh dưỡng thiết yếu không có trong môi trường nuôi cấy. Các trình tự kiểm soát biểu hiện có thể bao gồm các trình tự khởi đầu cấu trúc và cảm ứng được, vùng tăng cường phiên mã, trình tự kết thúc phiên mã và các trình tự tương tự đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Khi hai hoặc nhiều axit nucleic mã hóa ngoại sinh được đồng biểu hiện, cả hai axit nucleic này có thể được chèn, ví dụ vào một vectơ biểu hiện duy nhất hoặc các vectơ biểu hiện riêng biệt. Đối với quá trình biểu hiện ở một vectơ duy nhất, các axit nucleic mã hóa có thể được liên kết hoạt động với một trình tự kiểm soát biểu hiện chung hoặc liên kết với các trình tự kiểm soát biểu hiện khác nhau, như một trình tự khởi đầu cảm ứng được và một trình tự khởi đầu cấu trúc. Quá trình biến nạp các trình tự axit nucleic ngoại sinh tham gia vào quá trình

chuyển hóa hoặc sinh tổng hợp có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, phương pháp phân tích axit nucleic như thấm tách Northern hoặc phương pháp khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) ARN thông tin hoặc phương pháp thấm miễn dịch để biểu hiện các sản phẩm gen hoặc các phương pháp phân tích thích hợp khác để kiểm tra sự biểu hiện của trình tự axit nucleic đã được chèn vào hoặc sản phẩm gen tương ứng của nó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng axit nucleic ngoại sinh được biểu hiện với mức độ đủ để tạo ra sản phẩm mong muốn và cũng được hiểu rằng các mức độ biểu hiện có thể được tối ưu hóa để thu được sự biểu hiện ổn định bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này and như được bộc lộ trong sáng chế.

Các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế được thiết kế bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này như được minh họa trong sáng chế để biểu hiện ngoại sinh ít nhất một nucleic axit mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO với lượng đủ để sản sinh 4-HB, như 4-HB monome hoặc BDO. Được hiểu rằng các vi sinh vật theo sáng chế được nuôi cấy dưới các điều kiện đủ để sản sinh 4-HB hoặc BDO. Các mức độ biểu hiện tiêu biểu đối với các enzym sản sinh 4-HB trong mỗi quá trình được mô tả cụ thể hơn trong các ví dụ dưới đây. Theo các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế, các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể đạt được quá trình sinh tổng hợp 4-HB, như 4-HB monome hoặc BDO dẫn đến nồng độ bên trong tế bào của các hợp chất này nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 200mM hoặc cao hơn, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 25mM hoặc cao hơn. Nói chung, nồng độ bên trong tế bào của 4-HB, như 4-HB monome hoặc BDO là nằm trong khoảng từ 3mM đến 1,50mM hoặc cao hơn, cụ thể là nằm trong khoảng từ 5mM đến 125mM hoặc cao hơn và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 8mM đến 100mM, ví dụ, nằm trong khoảng từ 3mM đến 20mM, cụ thể là nằm trong khoảng từ 5mM đến 15mM và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 8mM đến 12mM, bao gồm khoảng 10mM, 20mM, 50mM, 80mM hoặc cao hơn. Nồng độ bên trong tế bào của các hợp chất này nằm trong hoặc cao hơn các khoảng trị số nêu trên cũng có thể thu được từ các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế. Theo các phương án cụ thể, các vi sinh vật theo sáng chế, cụ thể là các chủng cụ thể như đã được bộc lộ trong sáng chế (tham khảo các ví dụ 12-19 và bảng 28), có khả năng cải thiện quá trình sản sinh sản phẩm mong muốn như BDO bằng cách làm tăng quá trình sản sinh BDO và/hoặc làm giảm các sản phẩm phụ không mong muốn. Hiệu suất của quá trình này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hiệu suất đã được

bộc lộ trong sáng chế và bao gồm nằm trong khoảng từ 1gam/lít đến 2,5gam/lít, ví dụ khoảng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 1,5, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 hoặc thậm chí cao hơn tính theo khối lượng sản phẩm trên lít.

Theo một số phương án, các điều kiện nuôi cấy bao gồm các điều kiện sinh trưởng hoặc duy trì kỵ khí hoặc gần như kỵ khí. Ví dụ về các điều kiện kỵ khí đã được đề cập đến trước đó và được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Ví dụ về các điều kiện kỵ khí sử dụng trong các quy trình lên men được đề cập đến trong sáng chế và ví dụ, trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 11/891,602, nộp ngày 10/08/2007. Các điều kiện bất kỳ này có thể được sử dụng cho các vi sinh vật không có trong tự nhiên cũng như các điều kiện kỵ khí khác được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Dưới các điều kiện kỵ khí này, các sinh vật sản sinh 4-HB hoặc BDO có thể sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO ở nồng độ bên trong tế bào là nằm trong khoảng từ 5mM đến 10mM hoặc cao hơn cũng như tất cả các nồng độ khác được minh họa trong sáng chế. Được hiểu rằng, mặc dù phần mô tả nêu trên được sử dụng để chỉ các nồng độ bên trong tế bào, các vi sinh vật tổng hợp 4-HB hoặc BDO có thể sản sinh 4-HB hoặc BDO ở nội bào và/hoặc tiết sản phẩm vào trên môi trường nuôi cấy.

Các điều kiện nuôi cấy có thể bao gồm, ví dụ, các quy trình nuôi cấy lỏng cũng như các quy trình lên men hoặc quy trình nuôi cấy quy mô lớn khác. Như được mô tả trong sáng chế, năng suất đặc biệt hữu ích của các sản phẩm sinh tổng hợp theo sáng chế có thể thu được dưới các điều kiện nuôi cấy kỵ khí hoặc gần như kỵ khí.

Như được mô tả trong sáng chế, một ví dụ về điều kiện sinh trưởng để thu được quá trình sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO bao gồm các điều kiện nuôi cấy kỵ khí hoặc lên men. Theo một số phương án, các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể được duy trì, nuôi cấy hoặc lên men trong các điều kiện kỵ khí hoặc gần như kỵ khí. Nói ngắn gọn, các điều kiện kỵ khí được sử dụng để chỉ môi trường không chứa khí oxi. Các điều kiện gần như kỵ khí bao gồm, ví dụ, điều kiện nuôi cấy, lên men gián đoạn hoặc lên men liên tục sao cho nồng độ oxi hòa tan trong môi trường duy trì nằm trong khoảng từ 0% đến 10% nồng độ bão hòa. Các điều kiện gần như kỵ khí cũng bao gồm các tế bào sinh trưởng hoặc bất hoạt trong môi trường lỏng hoặc thạch rắn được chứa trong khoang kín được duy trì không khí có ít hơn 1% khí oxy. Phần trăm khí oxy có thể được duy trì ví dụ, bằng cách sục hỗn hợp N_2/CO_2 hoặc các khí không phải khí oxi thích hợp khác vào môi trường nuôi cấy.

Sáng chế cũng đề xuất chất xúc tác sinh học từ vi sinh vật không có trong tự nhiên bao gồm vi sinh vật có quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic (4-HB) và 1,4-butandiol (BDO) bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, 4-hydroxybutyrat:CoA transferaza, glutamat: suxinic semialdehyt transaminaza, glutamat decarboxylaza, aldehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, aldehyt dehydrogenaza hoặc rượu dehydrogenaza phụ thuộc CoA, trong đó axit nucleic ngoại sinh này được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh 1,4-butandiol (BDO). 4-Hydroxybutyrat:CoA transferaza cũng được biết đến là 4-hydroxybutyryl CoA:axetyl-CoA transferaza. Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO bổ sung cũng được bộc lộ trong sáng chế (tham khảo các ví dụ và Fig.8-13).

Sáng chế cũng đề xuất chất xúc tác sinh học từ vi sinh vật không có trong tự nhiên bao gồm vi sinh vật có quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic (4-HB) và 1,4-butandiol (BDO), các quá trình này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, 4-hydroxybutyrat:CoA transferaza, 4-butyrat kinaza, phosphotransbutyrylaza, alpha-ketoglutarat decarboxylaza, aldehyt dehydrogenaza, rượu dehydrogenaza hoặc aldehyt/rượu dehydrogenaza, trong đó axit nucleic ngoại sinh này được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh 1,4-butandiol (BDO).

Các vi sinh vật không có trong tự nhiên cũng có thể được tạo ra để sinh tổng hợp BDO. Như với các vi sinh vật sản sinh axit 4-HB theo sáng chế, các vi sinh vật sản sinh BDO cũng có thể sản sinh ở bên trong tế bào hoặc tiết BDO vào môi trường nuôi cấy. Theo các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất trước đó để thiết kế các vi sinh vật sản sinh 4-HB, các quá trình sản sinh BDO bổ sung có thể được liên hợp vào các vi sinh vật sản sinh 4-HB để tạo ra các vi sinh vật cũng sản sinh BDO và nhóm hợp chất BOD khác. Quá trình tổng hợp hóa học BDO và các sản phẩm thu được của nó đã được biết đến. Các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế có khả năng sinh tổng hợp BDO phá vỡ các quá trình tổng hợp hóa học này bằng cách sử dụng 4-HB làm nguyên liệu đầu vào như được minh họa trên Fig.1. Như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, các sinh vật sản sinh 4-HB cũng có thể được sử dụng để chuyển hóa hóa học 4-HB thành GBL và sau đó ví dụ, thành

BDO hoặc THF. Theo cách khác, các vi sinh vật sản sinh 4-HB có thể được cải biến thêm để có khả năng sinh tổng hợp để chuyển hóa 4-HB và/hoặc GBL thành BDO.

Các quá trình sản sinh BDO bổ sung để đưa vào các vi sinh vật sản sinh 4-HB bao gồm, ví dụ, quá trình biểu hiện ngoại sinh ở vi sinh vật chủ không có khả năng này hoặc quá trình biểu hiện quá mức của một hoặc nhiều enzym được thể hiện trên Fig.1 như các bước 9-13. Một quá trình như vậy bao gồm, ví dụ, các hoạt tính enzym cần thiết để thực hiện các phản ứng như được thế hiện ở các bước 9, 12 và 13 trên Fig.1, ở đó các enzym aldehyt và rượu dehydrogenaza có thể là các enzym riêng biệt hoặc enzym đa chức năng có cả hoạt tính aldehyt và rượu dehydrogenaza. Một quá trình như vậy khác bao gồm, ví dụ, các hoạt tính enzym cần thiết để thực hiện các phản ứng như được thế hiện ở các bước 10, 11, 12 và 13 trên Fig.1, cũng ở đó các enzym aldehyt và rượu dehydrogenaza có thể là các enzym riêng biệt hoặc enzym đa chức năng có cả hoạt tính aldehyt và rượu dehydrogenaza. Do đó, các quá trình sản sinh BDO bổ sung để đưa vào các vi sinh vật sản sinh 4-HB bao gồm, ví dụ, quá trình biểu hiện ngoại sinh ở vi sinh vật chủ không có khả năng này hoặc quá trình biểu hiện quá mức của một hoặc nhiều enzym 4-hydroxybutyrat:CoA transferaza, butyrat kinaza, phosphotransbutyrylaza, aldehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, aldehyt dehydrogenaza hoặc rượu dehydrogenaza phụ thuộc CoA. Khi không có mặt axyl-CoA syntetaza nội sinh có khả năng biến đổi 4-HB, các vi sinh vật sản sinh BDO không có trong tự nhiên có thể còn bao gồm axyl-CoA syntetaza ngoại sinh chọn lọc đối với 4-HB hoặc hỗn hợp nhiều enzym mà có quá trình biến đổi phản ứng thực 4-HB thành 4-HB-CoA. Như được minh họa cụ thể hơn trong các ví dụ dưới đây, butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza thể hiện hoạt tính tổng hợp BDO và xúc tác quá trình biến đổi cơ chất 4-HB được minh họa trên Fig.1. Do đó, các enzym này cũng có thể được sử dụng để chỉ tương ứng là 4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotranshydroxybutyrylaza.

Ví dụ về rượu và aldehyt dehydrogenaza có thể được sử dụng cho các quá trình biến đổi *in vivo* từ 4-HB thành BDO được liệt kê trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Rượu và aldehyt dehydrogenaza để biến đổi axit 4-HB thành BDO

RƯỢU DEHYDROGENAZA

ec:1.1.1.1 rượu dehydrogenaza
ec:1.1.1.2 rượu dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.1.1.4 (R,R)-butandiol dehydrogenaza
ec:1.1.1.5 axetoin dehydrogenaza
ec:1.1.1.6 glyxerol dehydrogenaza
ec:1.1.1.7 propandiol-phosphat dehydrogenaza
ec:1.1.1.8 glyxerol-3-phosphat dehydrogenaza (NAD+)
ec:1.1.1.11 D-arabinitol 4-dehydrogenaza
ec:1.1.1.12 L-arabinitol 4-dehydrogenaza
ec:1.1.1.13 L-arabinitol 2-dehydrogenaza
ec:1.1.1.14 L-iditol 2-dehydrogenaza
ec:1.1.1.15 D-iditol 2-dehydrogenaza
ec:1.1.1.16 galactitol 2-dehydrogenaza
ec:1.1.1.17 manitol-1-phosphat 5-dehydrogenaza
ec:1.1.1.18 inositol 2-dehydrogenaza
ec:1.1.1.21 aldehyt reductaza
ec:1.1.1.23 histidinol dehydrogenaza
ec:1.1.1.26 glyoxylat reductaza
ec:1.1.1.27 L-lactat dehydrogenaza
ec:1.1.1.28 D-lactat dehydrogenaza
ec:1.1.1.29 glyxerat dehydrogenaza
ec:1.1.1.30 3-hydroxybutyrat dehydrogenaza
ec:1.1.1.31 3-hydroxyisobutyrat dehydrogenaza
ec:1.1.1.35 3-hydroxyaxyl-CoA dehydrogenaza
ec:1.1.1.36 axetoaxetyl-CoA reductaza
ec:1.1.1.37 malat dehydrogenaza
ec:1.1.1.38 malat dehydrogenaza (khử carboxy hóa-oxaloaxetat)
ec:1.1.1.39 malat dehydrogenaza (khử carboxy hóa)
ec:1.1.1.40 malat dehydrogenaza (khử carboxy hóa-oxaloaxetat) (NADP+)
ec:1.1.1.41 isoxitrat dehydrogenaza (NAD+)
ec:1.1.1.42 isoxitrat dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.1.1.54 rượu allylic dehydrogenaza
ec:1.1.1.55 lactaldehyt reductaza (NADPH)
ec:1.1.1.56 ribitol 2-dehydrogenaza
ec:1.1.1.59 3-hydroxypropionat dehydrogenaza
ec:1.1.1.60 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza
ec:1.1.1.61 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza
ec:1.1.1.66 omega-hydroxydecanoat dehydrogenaza
ec:1.1.1.67 manitol 2-dehydrogenaza
ec:1.1.1.71 rượu dehydrogenaza [NAD(P)+]
ec:1.1.1.72 glyxerol dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.1.1.73 octanol dehydrogenaza
ec:1.1.1.75 (R)-aminopropanol dehydrogenaza
ec:1.1.1.76 (S,S)-butandiol dehydrogenaza
ec:1.1.1.77 lactaldehyt reductaza
ec:1.1.1.78 metylglyoxal reductaza (phụ thuộc-NADH)
ec:1.1.1.79 glyoxylat reductaza (NADP+)
ec:1.1.1.80 isopropanol dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.1.1.81 hydroxypyruvat reductaza
ec:1.1.1.82 malat dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.1.1.83 D-malat dehydrogenaza (khử carboxy hóa)
ec:1.1.1.84 dimetylmalat dehydrogenaza
ec:1.1.1.85 3-isopropylmalat dehydrogenaza
ec:1.1.1.86 ketol-axit reductoisomeraza
ec:1.1.1.87 homoisoxitrat dehydrogenaza
ec:1.1.1.88 hydroxymetylglutaryl-CoA reductaza
ec:1.1.1.90 rượu arylic dehydrogenaza
ec:1.1.1.91 rượu arylic dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.1.1.92 oxaloglycolat reductaza (khử carboxy hóa)
ec:1.1.1.94 glyxerol-3-phosphat dehydrogenaza [NAD(P)+]
ec:1.1.1.95 phosphoglyxerat dehydrogenaza
ec:1.1.1.97 rượu 3-hydroxybenzylic dehydrogenaza
ec:1.1.1.101 axylglyxeron-phosphat reductaza
ec:1.1.1.103 L-threonin 3-dehydrogenaza
ec:1.1.1.104 4-oxoprolin reductaza
ec:1.1.1.105 retinol dehydrogenaza
ec:1.1.1.110 indollactat dehydrogenaza
ec:1.1.1.112 indanol dehydrogenaza
ec:1.1.1.113 L-xyloza 1-dehydrogenaza
ec:1.1.1.129 L-threonat 3-dehydrogenaza
ec:1.1.1.137 ribitol-5-phosphat 2-dehydrogenaza
ec:1.1.1.138 manitol 2-dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.1.1.140 sorbitol-6-phosphat 2-dehydrogenaza
ec:1.1.1.142 D-pinitol dehydrogenaza
ec:1.1.1.143 sequoyitol dehydrogenaza
ec:1.1.1.144 rượu perillylic dehydrogenaza
ec:1.1.1.156 glyxerol 2-dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.1.1.157 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza
ec:1.1.1.163 xyclopentanol dehydrogenaza

ec:1.1.1.164 hexadecanol dehydrogenaza
ec:1.1.1.165 2-alkyn-1-ol dehydrogenaza
ec:1.1.1.166 hydroxyxyclohexancarboxylat dehydrogenaza
ec:1.1.1.167 hydroxymalonat dehydrogenaza
ec:1.1.1.174 xyclohexan-1,2-diol dehydrogenaza
ec:1.1.1.177 glyxerol-3-phosphat 1-dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.1.1.178 3-hydroxy-2-metylbutyryl-CoA dehydrogenaza
ec:1.1.1.185 L-glycol dehydrogenaza
ec:1.1.1.190 indol-3-axetaldehyt reductaza (NADH)
ec:1.1.1.191 indol-3-axetaldehyt reductaza (NADPH)
ec:1.1.1.192 rượu mạch dài dehydrogenaza

Bảng 1 (tiếp theo)

ec:1.1.1.194 rượu coniferylic dehydrogenaza
ec:1.1.1.195 rượu cinnamylic dehydrogenaza
ec:1.1.1.198 (+)-borneol dehydrogenaza
ec:1.1.1.202 1,3-propandiol dehydrogenaza
ec:1.1.1.207 (-)-mentol dehydrogenaza
ec:1.1.1.208 (+)-neomentol dehydrogenaza
ec:1.1.1.216 farnesol dehydrogenaza
ec:1.1.1.217 benzyl-2-metyl-hydroxybutyrat dehydrogenaza
ec:1.1.1.222 (R)-4-hydroxyphenyllactat dehydrogenaza
ec:1.1.1.223 isopiperitenol dehydrogenaza
ec:1.1.1.226 4-hydroxyxyclohexancarboxylat dehydrogenaza
ec:1.1.1.229 dietyl 2-metyl-3-oxosuxinat reductaza
ec:1.1.1.237 hydroxyphenylpyruvat reductaza
ec:1.1.1.244 metanol dehydrogenaza
ec:1.1.1.245 xyclohexanol dehydrogenaza
ec:1.1.1.250 D-arabinitol 2-dehydrogenaza
ec:1.1.1.251 galactitol 1-phosphat 5-dehydrogenaza
ec:1.1.1.255 manitol dehydrogenaza
ec:1.1.1.256 fluoren-9-ol dehydrogenaza
ec:1.1.1.257 4-(hydroxymetyl)benzensulfonat dehydrogenaza
ec:1.1.1.258 6-hydroxyhexanoat dehydrogenaza
ec:1.1.1.259 3-hydroxypimeloyl-CoA dehydrogenaza
ec:1.1.1.261 glyxerol-1-phosphat dehydrogenaza [NAD(P)+]
ec:1.1.1.265 3-metylbutanal reductaza
ec:1.1.1.283 metylglyoxal reductaza (phụ thuộc-NADPH)
ec:1.1.1.286 isoxitrat-homoisoxitrat dehydrogenaza
ec:1.1.1.287 D-arabinitol dehydrogenaza
(NADP+) butanol dehydrogenaza

ALDEHYT DEHYDROGENAZA
ec:1.2.1.2 format dehydrogenaza
ec:1.2.1.3 aldehyt dehydrogenaza (NAD+)
ec:1.2.1.4 aldehyt dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.2.1.5 aldehyt dehydrogenaza [NAD(P)+]
ec:1.2.1.7 benzaldehyt dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.2.1.8 betain-aldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.9 glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.2.1.10 axetaldehyt dehydrogenaza (axetyl hóa)
ec:1.2.1.11 aspartat-semialdehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.12 glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (phosphoryl hóa)
ec:1.2.1.13 glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (NADP+) (phosphoryl hóa)
ec:1.2.1.15 malonat-semialdehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.16 suxinat-semialdehyt dehydrogenaza [NAD(P)+]
ec:1.2.1.17 glyoxylat dehydrogenaza (axyl hóa)
ec:1.2.1.18 malonat-semialdehyt dehydrogenaza (axetyl hóa)
ec:1.2.1.19 aminobutyraldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.20 glutarat-semialdehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.21 glycolaldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.22 lactaldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.23 2-oxoaldehyt dehydrogenaza (NAD+)
ec:1.2.1.24 suxinat-semialdehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.25 2-oxoisovalerat dehydrogenaza (axyl hóa)
ec:1.2.1.26 2,5-dioxovalerat dehydrogenaza
ec:1.2.1.27 metylmalonat-semialdehyt dehydrogenaza (axyl hóa)
ec:1.2.1.28 benzaldehyt dehydrogenaza (NAD+)
ec:1.2.1.29 aldehyt arylic dehydrogenaza
ec:1.2.1.30 aldehyt arylic dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.2.1.31 L-aminoadipat-semialdehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.32 aminomuconat-semialdehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.36 retinal dehydrogenaza

ec:1.2.1.39	phenylaxetaldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.41	glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.42	hexadecanal dehydrogenaza (axyl hóa)
ec:1.2.1.43	format dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.2.1.45	4-carboxy-2-hydroxymuconat-6-semialdehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.46	formaldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.47	4-trimetylammoniobutyraldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.48	aldehyt mạch dài dehydrogenaza
ec:1.2.1.49	2-oxoaldehyt dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.2.1.51	pyruvat dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.2.1.52	oxoglutarat dehydrogenaza (NADP+)
ec:1.2.1.53	4-hydroxyphenylaxetaldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.57	butanal dehydrogenaza

Bảng 1 (tiếp theo)

ec:1.2.1.58	phenylglyoxylat dehydrogenaza (axyl hóa)
ec:1.2.1.59	glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (NAD(P)+) (phosphoryl hóa)
ec:1.2.1.62	4-formylbenzensulfonat dehydrogenaza
ec:1.2.1.63	6-oxohexanoat dehydrogenaza
ec:1.2.1.64	4-hydroxybenzaldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.65	salixylaldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.66	formaldehyt dehydrogenaza phụ thuộc mycothiol
ec:1.2.1.67	vanilin dehydrogenaza
ec:1.2.1.68	aldehyt coniferylic dehydrogenaza
ec:1.2.1.69	floaxetaldehyt dehydrogenaza
ec:1.2.1.71	suxinylglutamat-semialdehyt dehydrogenaza

Ví dụ về các enzym và quá trình khác được bộc lộ trong sáng chế (tham khảo các ví dụ). Ngoài ra, được hiểu rằng các enzym có thể được sử dụng để thực hiện các phản ứng, trong đó cơ chất không phải là cơ chất tự nhiên. Mặc dù, hoạt tính đối với cơ chất không tự nhiên có thể thấp hơn so với cơ chất tự nhiên, nhưng được hiểu rằng các enzym này có thể được sử dụng hoặc như có trong tự nhiên hoặc được gây đột biến bằng cách sử dụng quá trình tiến hóa có định hướng hoặc quá trình tiến hóa thích nghi, như được bộc lộ trong sáng chế (cũng tham khảo các ví dụ).

Quá trình sản sinh BDO thông qua các quá trình bất kỳ được bộc lộ trong sáng chế một phần được dựa trên việc phân loại các enzym thích hợp để biến đổi các tiền chất thành BDO. Số lượng các enzym đặc hiệu cho một vài bước phản ứng đã được xác định. Đối với các quá trình biến đổi này, trong đó các enzyme đặc hiệu với các tiền chất phản ứng chưa được xác định, enzym tiềm năng đã được xác định là thích hợp nhất để xúc tác các giai đoạn phản ứng. Các enzym này đã được chứng minh là có khả năng phản ứng với nhiều cơ chất, như được bộc lộ dưới đây. Ngoài ra, các tiến bộ trong lĩnh vực thiết kế protein cũng tạo ra tính khả thi để biến đổi các enzym này để tác động hiệu quả trên các cơ chất, thậm chí là không phải cơ chất tự nhiên. Được mô tả dưới đây là một số ví dụ về các enzym đặc hiệu phổ rộng từ các nhóm khác nhau thích hợp đối với quá trình sản sinh BDO cũng như các phương pháp đã được sử dụng để làm tiến hóa các enzym để tác động đối với các cơ chất không có trong tự nhiên.

Nhóm các enzym quan trọng tham gia vào quá trình sản sinh BDO là các oxidoreductaza biến đổi qua lại keton hoặc aldehyt thành rượu (1.1.1). Một số enzym tiêu biểu thuộc nhóm này có thể tác động trên phổ cơ chất rộng. Enzym rượu dehydrogenaza (1.1.1.1) được tinh chế từ vi khuẩn đất *Brevibacterium* sp KU 1309 (Hirano et al., *J. Biosc. Bioeng.* 100:318-322 (2005)) đã được chứng minh là tác dụng đối với nhiều rượu béo cũng như rượu thơm với hoạt tính cao. Bảng 2 thể hiện hoạt tính của enzym và hằng số K_m của nó trên các rượu khác nhau. Enzym này có khả năng xúc tác thuận nghịch và cũng có hoạt tính rất cao đối với một số aldehyt (bảng 3).

Bảng 2. Hoạt tính tương đối của rượu dehydrogenaza từ *Brevibacterium* sp KU để oxi hóa các rượu khác nhau.

Cơ chất	Hoạt tính tương đối (0%)	K_m (mM)
2-Phenyletanol	100*	0,025
(*S*)-2-Phenylpropanol	1,56	0,1,57
(*R*)-2-Phenylpropanol	63	0,020
Rượu bynzylic	199	0,012
3-Phenylpropanol	13,5	0,033
Etanol	76	
1-Butanol	111	
1-Octanol	101	
1-Dodecanol	68	
1-Phenyletanol	46	
2-Propanol	54	

*Hoạt tính của 2-phenyletanol, tương ứng với 19,2 U/mg, đã đạt được là 100%.

Bảng 3. Hoạt tính tương đối của rượu dehydrogenaza từ *Brevibacterium* sp KU 1309 để khử các hợp chất cacbonyl khác nhau.

Cơ chất	Hoạt tính tương đối (%)	K_m (mM)
Phenylaxetaldehyt	100	0,261
2-Phenylpropionaldehyt	188	0,864
1-Octylaldehyt	87	
Axetophenon	0	

Lactat dehydrogenaza (1.1.1,27) từ *Ralstonia eutropha* là một enzym khác đã được chứng minh là có hoạt tính cao trên một số 2-oxoaxit như 2-oxobutyrat, 2-oxopentanoat và 2-oxoglutarat (hợp chất C5 tương tự với 2-oxoadipat) (Steinbuchel and Schlegel, *Eur. J. Biochem.* 130:329-334 (1983)). Cột 2 ở bảng 4 chứng minh cho hoạt tính của *ldhA* từ *R.*

eutropha (*A. eutrophus* trước đây) trên các cơ chất khác nhau (Steinbuchel and Schlegel, *supra*, 1983).

Bảng 4. Hoạt tính *in vitro* của *R. eutropha ldhA* (Steinbuchel and Schlegel, *supra*, 1983) trên các cơ chất khác nhau và so với hoạt tính *in vitro* trên pyruvat.

Cơ chất		**Hoạt tính (%)**	
	L(+)-Lactat dehydrogenaza từ *A. eutrophus*	**L(+)-Lactat dehydrogenaza từ cơ thỏ**	**D(-)-Lactat dehydrogenaza từ *L. leichmanii***
Glyoxylat	8,7	23,9	5,0
Pyruvat	100,0	100,0	100,0
2-Oxobutyrat	107,0	18,6	1,1
2-Oxovalerat	125,0	0,7	0,0
3-Metyl-2-oxobutyrat	28,5	0,0	0,0
3-Metyl-2-oxovalerat	5,3	0,0	0,0
4-Metyl-2-oxopentanoat	39,0	1,4	1,1
Oxaloaxetat	0,0	33,1	23,1
2-Oxoglutarat	79,6	0,0	0,0
3-Flopyruvat	33,6	74,3	40,0

Các oxidoreductaza có thể biến đổi các 2-oxoaxit thành các hợp chất axyl-CoA tương tự của chúng (1.2.1) đã được chứng minh là có khả năng phản ứng với nhiều cơ chất. Ví dụ, phức hệ 2-keto-axit dehydrogenaza mạch nhánh (BCKAD), cũng được biết đến là 2-oxoisovalerat dehydrogenaza (1.2.1.25), tham gia vào các quá trình phân hủy axit amin mạch nhánh, biến đổi các dẫn xuất 2-keto axit của valin, leuxin và isoleuxin thành các dẫn xuất axyl-CoA của chúng và CO_2. Ở một số vi sinh vật bao gồm *Rattus norvegicus* (Paxton et al., *Biochem. J.* 234:295-303 (1986)) và *Saccharomyces cerevisiae* (Sinclair et al., *Biochem.mol Biol. Int.* 32:911-922 (1993), phức hệ này đã được chứng

minh là có khả năng phản ứng với nhiều cơ chất bao gồm các oxo-axit mạch thẳng như 2-oxobutanoat và alpha-ketoglutarat, ngoài các tiền chất của axit amin mạch nhánh.

Các enzym thuộc một lớp enzym khác, cụ thể là các aminotransferaza (2.6.1), đã được báo cáo là tác động trên nhiều cơ chất. Aspartat aminotransferaza (*aspAT)* từ *Pyrococcus fursious* đã được xác định, biểu hiện ở *E. coli* và protein tái tổ hợp đặc trưng để chứng minh rằng enzym này có hoạt tính cao nhất đối với aspartat và alpha-ketoglutarat nhưng có hoạt tính thấp hơn đáng kể đối với alanin, glutamat và các axit amin thơm (Ward et al., *Archaea* 133-141 (2002)). Trong trường hợp khác, aminotransferaza được xác định từ *Leishmania mexicana* và biểu hiện ở *E. coli* (Vernal et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 229:217-222 (2003)) được báo cáo là có tính đặc hiệu cơ chất rộng đối với tyroxin (hoạt tính được xem là 100% đối với tyroxin), phenylalanin (90%), tryptophan (85%), aspartat (30%), leuxin (25%) và metionin (25%) (Vernal et al.,mol. *Biochem. Parasitol* 96:83-92 (1998)). Tính đặc hiệu rộng tương tự đã được ghi nhận đối với tyroxin aminotransferaza từ *Trypanosoma cruzi*, mặc dù cả hai enzym này có độ tương đồng về trình tự chỉ là 6%. Enzym tyroxin aminotransferaza có thể chấp nhận leuxin, metionin cũng như tyroxin, phenylalanin, tryptophan và alanin làm các chất cho amin hiệu quả (Nowicki et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1,546: 268-281 (2001)).

Các CoA transferaza (2.8.3) đã được chứng minh là có khả năng hoạt động trên nhiều hơn một cơ chất. Đặc biệt là, CoA transferaza được tinh chế từ *Clostridium acetobutylicum* và được ghi nhận là có hoạt tính cao nhất đối với axetat, propionat và butyrat. Enzym này cũng có hoạt tính đáng kể đối với valerat, isobutyrat và crotonat (Wiesenborn et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 55:323-329 (1989)). Theo một nghiên cứu khác, enzym axyl-CoA:axetat-CoA transferaza của *E. coli*, cũng được biết đến là axetat-CoA transferaza (EC 2.8.3.8), đã được chứng minh là chuyển gốc CoA cho axetat từ nhiều cơ chất axyl-CoA mạch thẳng và mạch nhánh, bao gồm isobutyrat (Matthies and Schink, *App. Environm. Microbiol. 5*8:1435-1439 (1992)), valerat (Vanderwinkel et al., *Biochem. Biophys. Res Commun.* 33:902-908 (1968b)) và butanoat (Vanderwinkel et al., *Biochem. Biophys. Res Commun.* 33:902-908(1968a).

Các lớp enzym khác chứng minh thêm tính đặc hiệu cơ chất rộng đối với các enzym. Một số isomeraza (5.3.3) cũng được chứng minh là hoạt động trên nhiều cơ chất.

Ví dụ, L-rhamnoza isomeraza từ *Pseudomonas stutzeri* xúc tác phản ứng đồng phân hóa giữa các aldolaza và ketoza khác nhau (Yoshida et al., *J.mol. Biol.* 365:1505-1,516 (2007)). Bao gồm các phản ứng đồng phân hóa giữa L-rhamnoza và L-rhamnuloza, L-mannoza và L-fructoza, L-xyloza và L-xyluloza, D-riboza và D-ribuloza và D-alloza và D-psicoza.

Trong lớp enzym khác nữa, các phosphotransferaza (2.7.1), homoserin kinaza (2.7.1.39) từ *E. coli* biến đổi L-homoserin thành L-homoserin phosphat, được tìm thấy để phosphoryl hóa nhiều đồng đẳng của homoserin. Trong các cơ chất này, nhóm chức carboxyl ở vị trí R đã được thay thế bằng nhóm este hoặc nhóm hydroxymetyl (Huo and Viola, *Biochemistry* 35:16180-16185 (1996)). Bảng 5 chứng minh tính đặc hiệu cơ chất rộng của enzym kinaza này.

Bảng 5. Cơ chất đặc hiệu của homoserin kinaza.

Cơ chất	k_{cat}	% k_{cat}	K_m (mM)	k_{cat}/K_m
L-homoserin	18,3 ± 0,1	100	0,14 ± 0,04	184 ± 17
D-homoserin	8,3 ± 1,1	32	31,8 ± 7,2	0,26 ± 0,03
L-Aspartat β-semialdehyt	2,1 ± 0,1	8,2	0,28 ± 0,02	7,5 ± 0,3
L-2-amino-1,4-butandiol	2,0 ± 0,5	7,9	11,6 ± 6,5	0,17 ± 0,06
L-2-amino-5-hydroxyvalerat	2.5 ± 0,4	9,9	1,1 ± 0,5	2,3 ± 0,3
L-homoserin metyl este	14,7 ± 2,6	80	4,9 ± 2,0	3,0 ± 0,6
L-homoserin etyl este	13,6 ± 0,8	74	1,9 ± 0,5	7,2 ± 1,7
L-homoserin isopropyl este	13,6 ± 1,4	74	1,2 ± 0,5	11.3 ± 1,1
L-homoserin *n*-propyl este	14,0 ± 0,4	76	3,5 ± 0,4	4,0 ± 1,2

L-homoserin isobutyl este	16,4 ± 0,8	84	6,9 ± 1,1	2.4 ± 0,3
L-homserin *n*-butyl este	29,1 ± 1,2	160	5,8 ± 0,8	5,0 ± 0,5

Lớp enzym khác hữu ích trong quá trình sản sinh BDO là axit-thiol ligaza (6.2.1). Tương tự các enzym trong các nhóm khác, một số enzym trong nhóm này đã được chứng minh là có tính đặc hiệu cơ chất rộng. Ví dụ, axyl CoA ligaza từ *Pseudomonas putida* đã được chứng minh là có khả năng tác dụng trên nhiều cơ chất béo bao gồm các axit axetic, propionic, butyric, valeric, hexanoic, heptanoic và octanoic và hợp chất thơm như các axit phenylaxetic và phenoxyaxetic (Fernandez-Valverde et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). Enzym tương tự, malonyl CoA syntetaza (6.3.4.9) từ *Rhizobium trifolii* có thể biến đổi một số hợp chất diaxit, cụ thể là, etyl-, propyl-, alyl-, isopropyl-, dimetyl-, xyclopropyl-, xyclopropylmetylen-, xyclobutyl- và benzyl-malonat thành các hợp chất monothioeste tương ứng của chúng (Pohl et al., J. *Am. Chem. Soc.* 123:5822-5823 (2001)). Tương tự, decarboxylaza (4.1.1) cũng đã được chứng minh là có phổ cơ chất rộng. Pyruvat decarboxylaza (PDC), cũng được biết đến là keto-axit decarboxylaza, là enzym quan trọng trong quá trình lên men rượu, xúc tác phản ứng khử carboxyl pyruvat thành axetaldehyt. Enzym này được phân lập từ *Saccharomyces cerevisiae* có phổ cơ chất rộng đối với axit béo 2-keto bao gồm 2-ketobutyrat, 2-ketovalerat và 2-phenylpyruvat (Li and Jordan, *Biochemistry* 38:10004-10012 (1999)). Tương tự, benzoylformat decarboxylaza có phổ cơ chất rộng và được xem là mục tiêu của các nghiên cứu thiết kế enzym. Enzym từ *Pseudomonas putida* đã được nghiên cứu sâu rộng và các cấu trúc tinh thể của enzym này là sẵn có (Polovnikova et al., *Biochemistry* 42:1820-1830 (2003); Hasson et al., *Biochemistry* 37:9918-9930 (1998)). Alpha-ketoaxit decarboxylaza mạch nhánh (BCKA) đã được chứng minh là tác động trên nhiều hợp chất có chiều dài mạch cabon khác nhau từ 3 đến 6 nguyên tử cacbon (Oku and Kaneda, *J. Biol. Chem.* 263:18386-18396 (1998); Smit et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 71:303-311 (2005b)). Enzym từ *Lactococcus lactis* đã được mô tả đặc điểm trên nhiều cơ chất mạch thẳng và mạch nhánh bao gồm 2-oxobutanoat, 2-oxohexanoat, 2-oxopentanoat, 3-metyl-2-oxobutanoat, 4-metyl-2-oxobutanoat và isocaproat (Smit et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 71:303-311 (2005a).

Ngạc nhiên là, các enzym đã biết là có một hoạt tính nổi trội cũng được báo cáo là xúc tác các chức năng rất khác nhau. Ví dụ, phosphoglyxerat mutaza phụ thuộc đồng yếu tố (5.4.2.1) từ *Bacillus stearothermophilus* và *Bacillus subtilis* được biết là cũng có vai trò như phosphataza (Rigden et al., *Protein Sci.* 10:1835-1846 (2001)). Enzym từ *B. stearothermophilus* được biết là có hoạt tính đối với một số cơ chất, bao gồm 3-phosphoglyxerat, alpha-napthylphosphat, p-nitrophenylphosphat, AMP, fructoza-6-phosphat, riboza-5-phosphat và CMP.

Ngược lại với các ví dụ này ở đó, các enzym có tính đặc hiệu cơ chất rộng một cách tự nhiên, một số enzym đã được cải biến bằng cách sử dụng quá trình tiến hóa có định hướng để mở rộng tính đặc hiệu của chúng đối với các cơ chất không có trong tự nhiên của chúng. Theo cách khác, sự ưu tiên cơ chất của enzym cũng đã được thay đổi bằng cách sử dụng quá trình tiến hóa có định hướng. Do đó, có thể thiết kế được enzym nhất định cho chức năng hữu hiệu đối với cơ chất tự nhiên, ví dụ, cải thiện độ hiệu quả hoặc cơ chất không tự nhiên, ví dụ, làm tăng độ hiệu quả. Ví dụ, đã được ghi nhận rằng tính chọn lọc đồng phân đối ảnh của lipaza từ *Pseudomonas aeruginosa* đã được cải thiện đáng kể (Reetz et al., *Agnew. Chem. Int. Ed Engl.* 36:2830-2832 (1997)). Enzym này thủy phân p-nitrophenyl 2-metyldecanoat với chỉ 2% lượng dư chất đồng phân đối ảnh (ee) có lợi cho *(S)*-axit. Tuy nhiên, sau bốn chu kỳ gây đột biến và sàng lọc gen dễ bị lỗi liên tiếp, biến dị được tạo ra mà xúc tác phản ứng cần thiết với 81% ee (Reetz et al., *Agnew. Chem. Int. Ed Engl.* 36:2830-2832 (1997)).

Các phương pháp tiến hóa có định hướng đã được sử dụng để gây đột biến enzym để thực hiện chức năng trong thử nghiệm với các cơ chất không có trong tự nhiên. Tính đặc hiệu cơ chất của lipaza ở *P. aeruginosa* được mở rộng bằng cách ngẫu nhiên hóa các gốc axit amin gần vị trí hoạt động. Điều này cho phép enzym này chấp nhận các este của axit carboxylic được thế ở vị trí alpha (Reetz et al., *Agnew. Chem. Int. Ed Engl.* 44:4192-4196 (2005)). Trong quá trình cải biến enzym thành công khác, việc sắp xếp ADN được sử dụng để tạo ra aminotransferaza của *Escherichia coli* có thể chấp nhận các cơ chất có mạch nhánh bêta, mà enzym tự nhiên kém chấp nhận (Yano et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 9.5:5.511-5.51.5 (1998)). Đặc biệt là, tại thời điểm cuối của bốn chu kỳ sắp xếp gen, hoạt tính của aspartat aminotransferaza đối với valin và 2-oxovalin đã tăng lên 5 bậc cường độ, trong khi đó hoạt tính của enzym này đối với cơ chất aspartat tự nhiên giảm 30

lần. Gần đây, thuật toán được sử dụng để thiết kế retro-aldolaza có thể được sử dụng để xúc tác phân cắt liên kết cacbon-cacbon ở cơ chất không có bản chất sinh học và không có trong tự nhiên, 4-hydroxy-4-(6-metoxy-2-naphtyl)-2-butanon (Jiang et al., *Science* 319:1387-1391 (2008)). Các thuật toán này sử dụng các tổ hợp khác nhau gồm bốn môtip xúc tác khác nhau để thiết kế enzym mới và 20 thiết kế được chọn để mô tả đặc tính thử nghiệm có tốc độ phản ứng tăng gấp bốn lần so với phản ứng không được xúc tác (Jiang et al., *Science* 319:1387-1391 (2008)). Do đó, không chỉ các phương pháp thiết kế tiếp cận này có khả năng mở rộng phổ cơ chất mà enzym có thể tác động lên cơ chất đó, mà các phương pháp này cho phép thiết kế và tạo ra các enzym rất hiệu quả. Ví dụ, phương pháp chuyển vị ADN (tạo thể khảm ngẫu nhiên trên các khuôn thạm thời hoặc RACHITT) đã được ghi nhận để thu được monooxygenaza được thiết kế mà có tốc độ khử lưu huỳnh trên các cơ chất phức tạp được cải thiện cũng như tốc độ biến đổi cơ chất không có trong tự nhiên nhanh hơn 20 lần (Coco et al., *Nat. Biotechnol.* 19:354-3,59 (2001)). Tương tự, hoạt tính đặc hiệu của enzym triosephosphat isomeraza đột biến chậm đã được cải thiện lên đến 19 lần từ 1,3 lần (Hermes et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87:696-700 1990)). Việc cải thiện về hoạt tính đặc hiệu này được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên trên toàn bộ chiều dài chuỗi protein và việc cải thiện có thể được biểu hiện ngược trở lại các đột biến tại sáu gốc axit amin.

Hiệu quả của phương pháp tiếp cận thiết kế protein để thay đổi tính đặc hiệu cơ chất của enzym đối với cơ chất mong muốn cũng đã được chứng minh trong một số nghiên cứu. Isopropylmalat dehydrogenaza từ *Thermus thermophilus* được gây đột biến bằng cách biến đổi các gốc ở gần vị trí hoạt động để enzym này có thể tác động trên các cơ chất malat và D-Lactat (Fujita et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2695-2700 (2001)). Trong nghiên cứu này cũng như các nghiên cứu khác, đã chỉ ra rằng một hoặc một số gốc có thể được cải biến để làm thay đổi đổi tính đặc hiệu với cơ chất. Ví dụ, dihydroflavonol 4-reductaza trong đó một axit amin được biến đổi ở vùng gắn kết cơ chất giả định có thể khử dihydrokaempferol một cách ưu tiên (Johnson et al., *Plant. J.* 25:325-333 (2001)). Tính đặc hiệu cơ chất của isoxitrat dehydrogenaza rất đặc hiệu từ *Escherichia coli* được thay đổi từ isoxitrat thành isopropylmalat bằng cách thay đổi một gốc ở vị trí hoạt động (Doyle et al., *Biochemistry* 40:4234-4241 (2001)). Tương tự, tính đặc hiệu đồng nhân tố của 1,5-hydroxyprostaglandin dehydrogenaza phụ thuộc NAD^+ được biến đổi

thành $NADP^+$ bằng cách thay đổi một vài gốc ở gần đầu tận cùng N (Cho et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 419:139-146 (2003)). Phân tích mô hình phân tử và phân tích trình tự được sử dụng để xác định các gốc quan trọng để cải biến, chúng tiếp tục được nghiên cứu bằng quá trình gây đột biến điểm định hướng.

Một số ví dụ hiện có trải dài qua các lớp enzym khác nhau, trong đó chức năng của enzym được biến đổi để có lợi cho một cơ chất không có trong tự nhiên so với cơ chất có trong tự nhiên của enzym. Fucosidaza được tiến hóa từ galactosidaza ở *E. co*li bằng cách sắp xếp và sàng lọc ADN (Zhang et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 94:4,504-4,509 (1997)). Tương tự, aspartat aminotransferaza từ *E. coli* được biến đổi thành tyroxin aminotransferaza bằng cách sử dụng mô hình tương đồng và quá trình gây đột biến điểm định hướng (Onuffer and Kirsch, *Protein Sci.*, 4:1750-17,57 (1995)). Quá trình gây đột biến điểm định hướng hai gốc ở vị trí hoạt động của benzoylformat decarboxylaza từ *P. putida* đã được ghi nhận là làm thay đổi ái lực (K_m) đối với các cơ chất có trong tự nhiên và không có trong tự nhiên (Siegert et al., *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)). Cytocrom c peroxidaza (CCP) từ *Saccharomyces cerevisiae* được trải qua quá trình tiến hóa phân tử có định hướng để tạo ra các thể đột biến có hoạt tính tăng đối với guaiacol cơ chất kinh điển của peroxidaza, do đó làm thay đổi tính đặc hiệu cơ chất của CCP từ protein cytocrom c thành phân tử hữu cơ nhỏ. Sau ba chu kỳ sắp xếp và sàng lọc ADN, các thể đột biến được phân lập mà có hoạt tính tăng gấp 300 lần đối với guaiacol và tính đặc hiệu đối với cơ chất này tăng lên đến 1000 lần so với hoạt tính đối với cơ chất có trong tự nhiên (Iffland et al., *Biochemistry* 39:10790-10798 (2000)).

Trong một số trường hợp, đã thu được các enzym có sự ưu tiên cơ chất khác nhau hơn so với mỗi trong các enzym gốc. Ví dụ, quá trình phân hủy các biphenyl được polyclo hóa nhờ biphenyl-dioxygenaza được cải thiện bằng cách sắp xếp các gen từ hai vi khuẩn, *Pseudomonas pseudoalcaligens* và *Burkholderia cepacia* (Kumamaru et al., *Nat. Biotechnol.* 16:663-666 (1998)). Các biphenyl oxygenaza thể khảm thu được thể hiện sự ưu tiên cơ chất khác nhau hơn so với cả hai enzym gốc và cải thiện hoạt tính phân hủy đối với các hợp chất biphenyl và hydrocacbon đơn vòng thơm như toluen và benzen mà ban đầu là các cơ chất không đặc hiệu đối với enzym này.

Ngoài việc làm thay đổi tính đặc hiệu của enzym, cũng có thể cải thiện hoạt tính trên các cơ chất mà các enzym này có hoạt tính thấp trong tự nhiên. Một nghiên cứu đã chứng minh rằng amino axit raxemaza từ *P. putida* có tính đặc hiệu cơ chất rộng (trên lysin, arginin, alanin, serin, metionin, xystein, leuxin và histidin trong số các cơ chất khác) nhưng hoạt tính thấp đối với tryptophan có thể được cải thiện một cách đáng kể bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên (Kino et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:1299-1305 (2007)). Tương tự, vị trí hoạt động của BCKAD của bò được thiết kế để ưu tiên thay thế cơ chất axetyl-CoA (Meng and Chuang, *Biochemistry* 33:12879-12885 (1994)). Một khía cạnh đáng quan tâm của các phương pháp tiếp cận này là ngay cả khi các phương pháp ngẫu nhiên đã được sử dụng để tạo ra các enzym đột biến có hoạt tính hiệu quả này, các đột biến và biến đổi cấu trúc chính xác mà tạo ra sự cải thiện về hoạt tính có thể được xác định. Ví dụ, trong nghiên cứu nêu trên, các đột biến tạo điều kiện thuận lợi cho việc cải thiện hoạt tính đối với tryptophan được truy nguyên từ hai vị trí khác nhau

Quá trình tiến hóa có định hướng cũng được sử dụng để biểu hiện các protein khó biểu hiện. Ví dụ, bằng cách cho enzym peroxidaza từ cây củ cải ngựa trải qua trình gây đột biến ngẫu nhiên và tái tổ hợp gen, các thể đột biến được xác định là có hoạt tính cao gấp 14 lần so với enzym tự nhiên (Lin et al., *Biotechnol. Prog.* 15:467-471 (1999)).

Ví dụ khác về quá trình tiến hóa có định hướng thể hiện các cải biến bao quát mà enzym có thể được trải qua để thu được dải chức năng mong muốn. Enzym lactat dehydrogenaza từ *Bacillus stearothermophilus* được trải qua quá trình gây đột biến điểm định hướng và sự thay thế ba axit amin được tạo ra ở các vị trí được cho là để quyết định tính đặc hiệu đối với các hydroaxit khác nhau (Clarke et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148:15-23 (1987)). Sau các đột biến này, tính đặc hiệu đối với oxaloaxetat so với pyruvat đã tăng đến 500 trái ngược với enzym tự nhiên có tính đặc hiệu xúc tác đối với pyruvat so với oxaloaxetat là 1000. Enzym này tiếp tục được thiết kế bằng cách sử dụng quá trình gây đột biến điểm định hướng để thu được hoạt tính đối với các pyrutvat được thế mạch nhánh (Wilks et al., *Biochemistry* 29:8587-8591 (1990)). Đặc biệt là, enzym này có K_{cat} cải thiện 5,5 lần đối với alpha-ketoisocaproat. Ba cải biến cấu trúc được tạo ra ở enzym tương tự để thay đổi tính đặc hiệu cơ chất của nó từ lactat thành malat. Enzym này có hoạt tính cao và đặc hiệu đối với malat (Wilks et al., *Science* 242:1541-1544 (1988)). Sau đó, enzym tương tự từ *B. stearothermophilus* được thiết kế để thu được hoạt tính xúc

tác cao đối với các alpha-keto axit với các mạch nhánh tích điện dương, như các alpha-keto axit chứa các nhóm amoni (Hogan et al., *Biochemistry* 34:4225-4230 (1995)). Các thể đột biến với các axit amin có tính axit được chèn vào ở vị trí 102 thuộc enzym thích hợp cho việc liên kết của các nhóm amoni mạch nhánh này. Các kết quả thu được cho thấy rằng các thể đột biến này đã được cải thiện về trị số k_{cat}/K_m lên đến 2,5 lần đối với các cơ chất omega-amino-alpha-keto axit. Ngạc nhiên là, enzym này cũng được cải biến về cấu trúc để thực hiện chức năng như phenyllactat dehydrogenaza thay thế cho lactat dehydrogenaza (Wilks et al., *Biochemistry* 31:7802-7806 1992). Các vị trí hạn chế được chèn vào gen đối với enzym này cho phép vùng của gen được loại bỏ. Vũng này mã hóa cho vòng lặp bề mặt linh động của polypeptit (các gốc từ 98-110) mà bình thường che lấp vị trí hoạt động khỏi khối dung môi và là yếu tố quyết định chủ yếu tính đặc hiệu cơ chất. Các vòng lặp có trình tự và mạch dài có thể thay đổi được chèn vào sao cho các hydroxyaxit dehydrogenaza với tính đặc hiệu cơ chất đã biến đổi được tạo ra. Với một cấu trúc vòng lặp mạch dài hơn, hoạt tính đối với pyruvat đã giảm một triệu lần nhưng hoạt tính với phenylpyruvat phần lớn không thay đổi. Đạt được sự chuyển đổi tính đặc hiệu (k_{cat}/K_m) là 390.000 lần. Độ chọn lọc 1700:1 của enzym này đối với phenylpyruvat so với pyruvat là điều cần ở phenyllactat dehydrogenaza. Các nghiên cứu được mô tả nêu trên cho thấy rằng các phương pháp tiếp cận thiết kế enzym khác nhau có thể được sử dụng để thu được các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO như được bộc lộ trong sáng chế.

Như được bộc lộ trong sáng chế, quá trình sinh tổng hợp 1,4-butandiol từ một số hợp chất trung gian chuyển hóa chính có thể được sử dụng, bao gồm axetyl-CoA, suxinyl-CoA, alpha-ketoglutarat, glutamat, 4-aminobutyrat và homoserin. Axetyl-CoA, suxinyl-CoA và alpha-ketoglutarat là các hợp chất trung gian phổ biến của chu trình axit tricarboxylic (tricarboxylic axit-TCA), chuỗi các phản ứng có mặt trong toàn bộ chu trình ở hầu như tất cả các tế bào sống mà sử dụng oxy cho quá trình hô hấp tế bào và có mặt ở dạng được rút ngắn ở một số sinh vật kỵ khí. Glutamat là axit amin thu được từ alpha-ketoglutarat thông qua glutamat dehydrogenaza hoặc một số phản ứng chuyển amin bất kỳ (tham khảo, Fig.8B). Hợp chất 4-aminobutyrat có thể được tạo thành từ quá trình khử carboxyl glutamat (tham khảo, Fig.8B) hoặc từ axetoaxetyl-CoA thông qua quá trình được bộc lộ trên Fig.9C. Hợp chất axetoaxetyl-CoA thu được từ quá trình ngưng tụ hai phân tử axetyl-CoA theo phương thức enzym, axetyl-coenzym A axetyltransferaza hoặc tương

đương, axetoaxetyl-coenzym A thiolaza. Homoserin là hợp chất trung gian trong quá trình chuyển hóa threonin và metionin, được tạo thành từ oxaloaxetat thông qua aspartat. Quá trình biến đổi oxaloaxetat thành homoserin cần một NADH, hai NADPH và một ATP.

Các quá trình khác với các quá trình được mô tả nêu trên cũng có thể được sử dụng để tạo ra quá trình sinh tổng hợp BDO ở các vi sinh vật không có trong tự nhiên. Theo một phương án, quá trình sinh tổng hợp có thể đạt được bằng cách sử dụng quá trình biến đổi từ L-homoserin thành BDO (tham khảo, Fig.13). Quá trình này có hiệu suất phân tử là 0,90mol/mol glucoza, mà dường như bị hạn chế bởi độ khả dụng của các đương lượng khử. Quá trình thứ hai sinh tổng hợp BDO từ axetoaxetyl-CoA và có khả năng đạt được hiệu suất lý thuyết tối đa là 1,091mol/mol glucoza (tham khảo, Fig.9). Việc thực hiện một trong hai quá trình này có thể đạt được bằng cách chèn thêm hai enzym ngoại sinh vào sinh vật chủ như *E. coli* và cả hai quá trình này có thể bổ sung thêm quá trình sản sinh BDO thông qua suxinyl-CoA. Các enzym tham gia vào quá trình, quá trình nhiệt động, hiệu suất lý thuyết và tính khả thi toàn diện tiếp tục được mô tả dưới đây

Quá trình sản sinh homoserin cũng có thể được thiết kế để tạo ra các vi sinh vật sản sinh BDO. Homoserin là hợp chất trung gian trong quá trình chuyển hóa threonin và metionin, được tạo thành từ oxaloaxetat thông qua aspartat. Quá trình biến đổi oxaloaxetat thành homoserin cần một NADH, hai NADPH và một ATP (Fig.2). Một khi được tạo thành, homoserin tham gia vào quá trình sinh tổng hợp cho cả threonin và metionin. Ở hầu hết các vi sinh vật, nồng độ threonin hoặc metionin cao tác động ngược trở lại để ức chế quá trình sinh tổng hợp homoserin (Caspi et al., *Nucleic Axits Res.* 34:D511-D516 (1990)).

Quá trình biến đổi homoserin thành 4-hydroxybutyrat (4-HB) có thể được thực hiện qua hai giai đoạn phản ứng enzym như được mô tả trong sáng chế. Giai đoạn đầu tiên của quá trình này là khử amin của homoserin bằng amoniac lyaza giả định. Ở giai đoạn thứ hai, sản phẩm alken, 4-hydroxybut-2-enoat được khử thành 4-HB bằng reductaza giả định với chi phí năng lượng là một NADH. Sau đó, 4-HB có thể được biến đổi thành BDO.

Các enzym sẵn có để xúc tác quá trình biến đổi trên được bộc lộ trong sáng chế. Ví dụ, amoniac lyaza ở giai đoạn 1 của quá trình này có cấu trúc hóa học khá tương đồng với aspartat amoniac-lyaza (aspartaza). Aspartaza là enzym phổ rộng ở các vi sinh vật và đã được mô tả đặc tính rộng rãi (Viola, R.E.,mol. *Biol.* 74:295-341 (2008)). Cấu trúc tinh thể

của aspartaza ở *E. coli* đã được mô tả (Shi et al., *Biochemistry* 36:9136-9144 (1997)), do đó, có thể thiết kế có định hướng các đột biến ở vị trí hoạt động của enzym mà sẽ làm biến đổi tính đặc hiệu cơ chất của enzym này để bao gồm homoserin. Enzym oxidoreductaza ở giai đoạn 2 có cấu trúc hóa học tương đồng với một số enzym đã được mô tả đặc tính cụ thể bao gồm fumarat reductaza trong chu trình TCA của *E. coli*. Do quá trình nhiệt động của phản ứng này là rất thuận lợi, nên reductaza nội sinh có tính đặc hiệu cơ chất rộng sẽ có khả năng khử 4-hydroxybut-2-enoat. Hiệu suất của quá trình này dưới các điều kiện kỵ khí là 0,9mol BDO trên mol glucoza.

Quá trình suxinyl-CoA được thấy là có hiệu suất cao hơn do thực tế là quá trình này hiệu quả hơn về mặt năng lượng. Quá trình biến đổi một phân tử oxaloaxetat thành BDO thông qua quá trình homoserin sẽ đòi hỏi chi phí năng lượng là 2 đương lượng ATP. Do quá trình biến đổi glucoza thành hai phân tử oxaloaxetat có thể tạo ra tối đa 3 phân tử ATP giả định rằng PEP carboxykinaza là thuận nghịch, toàn bộ quá trình biến đổi glucoza thành BDO thông qua homoserin có hiệu suất năng lượng âm. Như được kỳ vọng, nếu giả định rằng, năng lượng có thể được tạo ra thông qua quá trình hô hấp, hiệu suất tối đa của quá trình homoserin tăng lên đến 1,05mol/mol glucoza là 96% là hiệu suất quá trình suxinyl-CoA. Quá trình suxinyl-CoA có thể chuyển một số thông lượng cacbon thông qua pyruvat dehydrogenaza và nhánh oxi hóa của chu trình TCA để tạo thành cả các đương lượng khử và suxinyl-CoA mà không đòi hỏi chi phí năng lượng. Do đó, quá trình này không gặp trở ngại về mặt năng lượng tương tự như quá trình homoserin do không phải toàn bộ chu trình được chuyển đổi thông qua oxaloaxetat thành suxinyl-CoA thành BDO. Nhìn chung, quá trình homoserin là quá trình có hiệu suất cao để sinh tổng hợp 1,4-butandiol.

Quá trình axetoaxetat cũng có thể được thiết kế để tạo ra các vi sinh vật sản sinh BDO. Axetoaxetat có thể được tạo thành từ axetyl-CoA bởi các enzym tham gia vào quá trình chuyển hóa axit béo, bao gồm axetyl-CoA axetyltransferaza và axetoaxetyl-CoA transferaza. Các quá trình sinh tổng hợp thông qua axetoaxetat cũng đặc biệt hữu ích trong các vi sinh vật mà có thể chuyển hóa các hợp chất cacbon đơn như cacbon monoxit, cacbon dioxit hoặc metanol để tạo thành axetyl-CoA.

Ba giai đoạn biến đổi từ axetoaxetyl-CoA thành 4-aminobutyrat (tham khảo, Fig.9C) có thể được sử dụng để sinh tổng hợp BDO thông qua axetoaxetyl-CoA. Hợp chất

4-aminobutyrat có thể được biến đổi thành suxinic semialdehyt như được thể hiện trên Fig.8B. Suxinic semialdehyt, là một hợp chất trung gian của giai đoạn khử được loại bỏ từ suxinyl-CoA hoặc một hợp chất trung gian của giai đoạn khử carboxyl được loại bỏ từ alpha-ketoglutarat, có thể được biến đổi thành BDO theo ba giai đoạn khử (Fig.1). Nói tóm lại, giai đoạn 1 của quá trình này bao gồm quá trình biến đổi axetoaxetyl-CoA thành axetoaxetat, ví dụ, bởi axetoaxetyl-CoA transferaza của *E. coli* được mã hóa bởi các gen *atoA* và *atoD* (Hanai et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7814-7818 (2007)). Giai đoạn 2 của quá trình sinh tổng hợp axetoaxetyl-CoA dẫn đến quá trình biến đổi axetoaxetat thành 3-aminobutanoat bởi ω-aminotransferaza. Enzym ω-amino axit:Pyruvat aminotransferaza (ω-APT) từ *Alcaligens denitrificans* được biểu hiện quá mức ở *E. colI* và cho thấy có hoạt tính cao đối với 3-aminobutanoat *in vitro* (Yun et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2,529-2,534 (2004)). Ở giai đoạn 2, aminomutaza giả định chuyển vị nhóm amin từ vị trí số 3 sang vị trí số 4 của mạch cacbon. Enzym aminomutaza thực hiện chức năng này trên cơ chất 3-aminobutanoat chưa được mô tả đặc tính, nhưng một enzym từ *Clostridium sticklandii* có cơ chế rất tương tự đã được mô tả. Enzym D-lysin-5,6-aminomutaza, tham gia vào quá trình sinh tổng hợp lysin.

Quá trình sản sinh BDO từ axetoaxetyl-CoA thông qua 4-aminobutanoat, chất chuyển hóa ở *E. coli* mà bình thường được tạo thành từ quá trình khử carboxyl của glutamat. Một khi được tạo ra, 4-aminobutanoat có thể được biến đổi thành suxinic semialdehyt bởi 4-aminobutanoat transaminaza (2.6.1.19), enzym này đã được mô tả đặc tính sinh hóa.

Một sự cân nhắc để lựa chọn các enzym tiềm năng vào quá trình này là tính chọn lọc đồng phân lập thể của các enzym tham gia vào các giai đoạn 2 và 3. Enzym ω-ABT từ *Alcaligens denitrificans* là đặc hiệu đối với chất đồng phân lập thể dạng L của 3-aminobutanoat, trong khi đó D-lysin-5,6-aminomutaza yêu cầu chất đồng phân lập thê dạng D. Nếu các enzym có tính chọn lọc đồng phân lập thể bổ sung ban đầu không được tìm thấy hoặc thiết kế, enzym thứ ba có thể được bổ sung vào quá trình này có hoạt tính raxemaza mà có thể biến đổi L-3-aminobutanoat thành D-3-aminobutanoat. Trong khi đó các enzym amino axit raxemaza là enzym phổ rộng, liệu các enzym này có thể thực hiện chức năng trên các ω-amino axit hay không vẫn chưa được biết đến.

Hiệu suất mol lý thuyết tối đa của quá trình này dưới các điều kiện kỵ khí là 1,091mol/mol glucoza. Để tạo thành chu trình từ axetoaxetyl-CoA thành BDO cần giả định rằng axetyl-CoA:axetoaxetyl-CoA transferaza là thuận nghịch. Chức năng của enzym này ở *E. coli* là để chuyển hóa các axit béo mạch ngắn bằng cách trước hết biến đổi chúng thành các thioeste.

Trong khi quá trình hoạt động của axetyl-CoA:axetoaxetyl-CoA transferaza theo hướng tiêu thụ axetat chưa được chứng minh bằng thực nghiệm ở *E. coli*, các nghiên cứu trên các enzym tương tự ở các vi sinh vật khác hỗ trợ giả định rằng phản ứng này là thuận nghịch. Enzym butyryl-CoA:axetat:CoA transferaza ở các vi khuẩn đường ruột *Roseburia* sp. và *F. prasnitzii* tác động theo hướng sử dụng axetat để sản sinh butyrat (Duncan et al., *Appl. Environ. Microbiol* 68:5186-5190 (2002)). Một enzym rất tương tự khác, axetyl:suxinat CoA-transferaza ở *Trypanosoma brucei*, cũng tác động theo hướng sử dụng axetat. Phản ứng này có $\Delta_{rxn}G$ gần đạt trạng thái cân bằng, vì thế nồng độ axetat cao có thể đưa phản ứng theo hướng mong muốn. Ở tốc độ sản sinh BDO lý thuyết tối đa là 1,09mol/mol glucoza, quá trình mô phỏng dự đoán rằng *E. coli* có thể tạo ra 1,098mol ATP trên mỗi mol glucoza mà không có các sản phẩm phụ của quá trình lên men. Hiệu suất ATP này sẽ đủ cho quá trình sinh trưởng, duy trì và sản sinh của tế bào. Quá trình sinh tổng hợp axetoaxetyl-CoA là quá trình sản sinh BDO từ axetyl-CoA có năng suất cao.

Do đó, ngoài các cải biến khác nhau bất kỳ đã được bộc lộ trước đó để tạo ra quá trình sinh tổng hợp 4-HB ở sinh vật chủ được chọn, các vi sinh vật sản sinh BDO có thể bao gồm các tổ hợp và hoán vị bất kỳ trước đó của các cải biến chuyển hóa quá trình sản sinh 4-HB cũng như tổ hợp biểu hiện bất kỳ cho aldehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, aldehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA hoặc rượu dehydrogenaza hoặc các enzym khác được bộc lộ trong sáng chế để tạo thành các quá trình sinh tổng hợp cho GBL và/hoặc BDO. Do đó, các vi sinh vật sản sinh BDO theo sáng chế có thể có sự biểu hiện ngoại sinh, ví dụ, một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc lên đến tất cả các enzym tương ứng với các enzym tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB và/hoặc BDO bất kỳ được bộc lộ trong sáng chế.

Việc thiết kế và tạo cấu trúc các vi sinh vật được cải biến di truyền được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này để thu

được mức độ biểu hiện đủ để sản sinh BDO. Đặc biệt là, các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể đạt được quá trình sinh tổng hợp BDO dẫn đến nồng độ bên trong tế bào nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 200mM, hoặc cao hơn như nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 25mM hoặc lớn hơn, như được bộc lộ nêu trên. Ví dụ, nồng độ bên trong tế bào của BDO là nằm trong khoảng từ 3mM đến 20mM, cụ thể là nằm trong khoảng từ 5mM đến 15mM và cụ thể hơn nữa là nằm trong khoảng từ 8mM đến 12mM, bao gồm khoảng 10mM hoặc lớn hơn. Các nồng độ bên trong tế bào nằm trong khoảng hoặc lớn hơn các khoảng giá trị này cũng có thể đạt được từ các vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế. Đối với các vi sinh vật sản sinh 4-HB, các vi sinh vật sản sinh BDO cũng có thể được duy trì, nuôi cấy hoặc lên men dưới các điều kiện kỵ khí.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất 4-HB. Phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic (4-HB) bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, glutamat:suxinic semialdehyt transaminaza, alpha-ketoglutarat decarboxylaza hoặc glutamat glutamat decarboxylaza dưới các điều kiện gần như kỵ khí trong khoảng thời gian đủ để sản sinh axit 4-hydroxybutanoic monome (4-HB). Phương pháp này có thể còn bao gồm quá trình biến đổi hóa học, ví dụ từ 4-HB thành GBL và thành BDO hoặc THF.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất 4-HB. Phương pháp này bao gồm quá trình nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic (4-HB) bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA hoặc alpha-ketoglutarat decarboxylaza dưới các điều kiện gần như kỵ khí trong khoảng thời gian đủ để sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic monome (4-HB). Sản phẩm 4-HB có thể được tiết vào môi trường nuôi cấy.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất BDO. Phương pháp này bao gồm quá trình nuôi cấy vi sinh vật hoặc vi sinh vật xúc tác sinh học không có trong tự nhiên có các quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic (4-HB) và 1,4-butandiol (BDO), các quá trình sản sinh này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa 4-hydroxybutanoat

dehydrogenaza, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, 4-hydroxybutyrat:CoA transferaza, 4-hydroxybutyrat kinaza, phosphotranshydroxybutyrylaza, alpha-ketoglutarat decarboxylaza, aldehyt dehydrogenaza, rượu dehydrogenaza hoặc aldehyt/rượu dehydrogenaza trong khoảng thời gian đủ để sinh tổng hợp 1,4-butandiol (BDO). Sản phẩm BDO có thể được tiết vào môi trường nuôi cấy.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất BDO bằng cách nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sản sinh BDO theo sáng chế. Quá trình sản sinh BDO có thể bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, dưới các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO bao gồm 4-aminobutyrat CoA transferaza, 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza, 4-aminobutyrat-CoA ligaza, 4-aminobutyryl-CoA oxidoreductaza (khử amin), 4-aminobutyryl-CoA transaminaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza (tham khảo ví dụ 7 và bảng 17).

Theo cách khác, quá trình sản sinh BDO có thể bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, dưới các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO bao gồm 4-aminobutyrat CoA transferaza, 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza, 4-aminobutyrat-CoA ligaza, 4-aminobutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-aminobutyryl-CoA reductaza, 4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza, 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin) hoặc 4-aminobutan-1-ol transaminaza (tham khảo ví dụ 7 và bảng 18).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất BDO, phương pháp này bao gồm quá trình nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sản sinh BDO, quá trình này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, dưới các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO bao gồm 4-aminobutyrat kinaza, 4-aminobutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa), 4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza, 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin), 4-aminobutan-1-ol transaminaza, axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic oxidoreductaza

(khử amin), axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic transaminaza, 4-hydroxybutyryl-phosphat dehydrogenaza hoặc 4-hydroxybutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (tham khảo ví dụ 7 và bảng 19).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất BDO, phương pháp này bao gồm quá trình nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sản sinh BDO, quá trình này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, dưới các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO bao gồm alpha-ketoglutarat 5-kinaza, 2,5-dioxopentanoic semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa), axit 2,5-dioxopentanoic reductaza, alpha-ketoglutarat CoA transferaza, alpha-ketoglutaryl-CoA hydrolaza, alpha-ketoglutaryl-CoA ligaza, alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza, alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza (tạo thành rượu), axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza hoặc axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl) (tham khảo ví dụ 8 và bảng 20).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất BDO, phương pháp này bao gồm quá trình nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sản sinh BDO, quá trình này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, dưới các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO bao gồm glutamat CoA transferaza, glutamyl-CoA hydrolaza, glutamyl-CoA ligaza, glutamat 5-kinaza, glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa), glutamyl-CoA reductaza, glutamat-5-semialdehyt reductaza, glutamyl-CoA reductaza (tạo thành rượu), axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza (khử amin), axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl) (tham khảo ví dụ 9 và bảng 21).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất BDO, phương pháp này bao gồm quá trình nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sản sinh BDO, quá trình này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, dưới các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO bao gồm 3-

hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza, vinylaxetyl-CoA Δ-isomeraza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza (tham khảo ví dụ 10 và bảng 22).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất BDO, phương pháp này bao gồm quá trình nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sản sinh BDO, quá trình này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, dưới các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO bao gồm homoserin deaminaza, homoserin CoA transferaza, homoserin-CoA hydrolaza, homoserin-CoA ligaza, homoserin-CoA deaminaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA transferaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA ligaza, 4-hydroxybut-2-enoat reductaza, 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza, 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza hoặc 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA reductaza (tham khảo ví dụ 11 và bảng 23).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất BDO, phương pháp này bao gồm quá trình nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sản sinh BDO, quá trình này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, dưới các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO bao gồm suxinyl-CoA reductaza (tạo thành rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza, 4-hydroxybutanal dehydrogenaza (phosphoryl hóa). Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO này có thể còn bao gồm suxinyl-CoA reductaza, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza, 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza, 4-hydroxybutyrat kinaza, phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) hoặc 1,4-butandiol dehydrogenaza.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất BDO, phương pháp này bao gồm quá trình nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sản sinh BDO, quá trình này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO, dưới các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để sản sinh BDO, quá trình sản sinh BDO bao gồm glutamat

dehydrogenaza, 4-aminobutyrat oxidoreductaza (khử amin), 4-aminobutyrat transaminaza, glutamat decarboxylaza, 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza, 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza, 4-hydroxybutanal dehydrogenaza (phosphoryl hóa).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm mong muốn bằng cách sử dụng các vi sinh vật được cải biến di truyền được bộc lộ trong sáng chế cho phép cải thiện quá trình sản sinh sản phẩm mong muốn như BDO bằng cách làm tăng sản phẩm mong muốn hoặc giảm sản phẩm phụ không mong muốn. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất 1,4-butandiol (BDO), phương pháp này bao gồm quá trình nuôi cấy các vi sinh vật không có trong tự nhiên được bộc lộ trong sáng chế dưới các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để sản sinh BDO. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất BDO bằng cách sử dụng vi sinh vật không có trong tự nhiên bao gồm vi sinh vật có quá trình sản sinh 1,4-butandiol (BDO), bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sản sinh BDO. Theo một phương án, vi sinh vật được cải biến di truyền để biểu hiện suxinyl-CoA syntetaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 12). Ví dụ, suxinyl-CoA syntetaza có thể được mã hóa bởi các gen *sucCD* của *Escherichia coli*.

Theo một phương án khác, vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện alpha-ketoglutarat decarboxylaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 13). Ví dụ, alpha-ketoglutarat decarboxylaza có thể được mã hóa bởi gen *sucA* của *Mycobacterium bovis*. Theo một phương án khác nữa, vi sinh vật được cải biến di truyền để biểu hiện suxinat semialdehyt dehydrogenaza và 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza ngoại sinh và tùy ý 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 13). Ví dụ, suxinat semialdehyt dehydrogenaza (phụ thuộc CoA), 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza và 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza có thể được mã hóa bởi các gen W83 của *Porphyromonas gingivalis*. Theo phương án bổ sung, vi sinh vật được cải biến di truyền để biểu hiện butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 13). Ví dụ, butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza có thể được mã hóa bởi các gen *buk1* và *ptb* của *Clostridium acetobutilicum*.

Theo một phương án khác nữa, vi sinh vật được cải biến di truyền để biểu hiện 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 13). Ví dụ, 4-hydroxybutyryl-

CoA reductaza có thể được mã hóa bởi gen *ald* của *Clostridium beijerinckii*. Ngoài ra, theo một phương án của sáng chế, vi sinh vật được cải biến di truyền để biểu hiện 4-hydroxybutanal reductaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 13). Ví dụ, 4-hydroxybutanal reductaza có thể được mã hóa bởi gen *adh1* của *Geobacillus thermoglucosidasius*. Theo một phương án khác, vi sinh vật được cải biến di truyền để biểu hiện các tiểu đơn vị pyruvat dehydrogenaza (tham khảo ví dụ 14). Ví dụ, pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh có thể là pyruvat dehydrogenaza nhạy NADH. Tiểu đơn vị pyruvat dehydrogenaza có thể được mã hóa bởi gen *lpdA* của *Klebsiella pneumonia lpdA*. Theo phương án cụ thể, các gen mã hóa tiểu đơn vị pyruvat dehydrogenaza của vi sinh vật có thể chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mã hóa cho pyruvat format lyaza.

Theo một phương án khác nữa, vi sinh vật được cải biến di truyền để phá vỡ gen mã hóa hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí (tham khảo ví dụ 15). Ví dụ, có thể phá vỡ gen *arcA*. Các vi sinh vật này còn có thể được cải biến di truyền để phá vỡ gen mã hóa malat dehydrogenaza. Theo phương án khác nữa, vi sinh vật được cải biến di truyền để biểu hiện xitrat syntaza nhạy NADH ngoại sinh (tham khảo ví dụ 15). Ví dụ, xitrat syntaza nhạy NADH có thể được mã hóa bởi gen *gltA*, như thể đột biến R163L của *gltA*. Theo một phương án khác nữa, vi sinh vật được cải biến di truyền để biểu hiện phosphoenolpyruvat carboxykinaza ngoại sinh (tham khảo ví dụ 16). Ví dụ, phosphoenolpyruvat carboxykinaza có thể được mã hóa bởi gen mã hóa cho phosphoenolpyruvat carboxykinaza của *Haemophilus influenza*. Được hiểu rằng, các chủng được bộc lộ trong sáng chế để cải thiện quá trình sản sinh BDO có thể được sử dụng tương tự nhau, với các cải biến thích hợp, để sản sinh các sản phẩm mong muốn khác, ví dụ, 4-hydroxybutyrat hoặc các sản phẩm mong muốn khác được bộc lộ trong sáng chế.

Được hiểu rằng, theo phương pháp của sáng chế, một hoặc nhiều axit nucleic ngoại sinh bất kỳ có thể được chèn vào vi sinh vật để tạo ra vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế. Các axit nucleic có thể được chèn vào để thu được quá trình sinh tổng hợp, ví dụ, 4-HB, BDO, THF hoặc GBL ở vi sinh vật. Theo cách khác, các axit nucleic mã hóa có thể được chèn vào để tạo ra vi sinh vật trung gian có khả năng sinh tổng hợp để xúc tác một số phản ứng mong muốn để thu được khả năng sinh tổng hợp 4-HB, BDO, THF hoặc GBL. Ví dụ, vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sinh tổng hợp 4-HB có thể

bao gồm ít nhất hai axit nucleic ngoại sinh mã hóa các enzym mong muốn, như hỗn hợp của 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza và alpha-ketoglutarat decarboxylaza; 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza và suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA; 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza và suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA; suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA và suxinyl-CoA syntetaza; suxinyl-CoA syntetaza và glutamat decarboxylaza và hỗn hợp enzym tương tự. Do đó, được hiểu rằng tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp có thể được chứa trong vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế. Tương tự, được hiểu rằng tổ hợp bất kỳ của ba hoặc nhiều enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp có thể được chứa trong vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế, ví dụ, 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, alpha-ketoglutarat decarboxylaza và suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA; suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA và suxinyl-CoA syntetaza; 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA và glutamat:suxinic semialdehyt transaminaza và nhiều enzym khác, như mong muốn, miễn là tổ hợp các enzyme này tham gia vào quá trình sinh tổng hợp mong muốn dẫn đến quá trình sản sinh sản phẩm mong muốn tương ứng.

Tương tự, ví dụ, đối với một hoặc nhiều axit nucleic ngoại sinh bất kỳ được chèn vào để tạo ra khả năng sản sinh BDO, vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sinh tổng hợp BDO có thể bao gồm ít nhất hai axit nucleic ngoại sinh mã hóa các enzym mong muốn, như tổ hợp của 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza và alpha-ketoglutarat decarboxylaza; 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza và 4-hydroxybutyryl CoA:axetyl-CoA transferaza; 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza và butyrat kinaza; 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza and phosphotransbutyrylaza; 4-hydroxybutyryl CoA:axetyl-CoA transferaza và aldehyt dehydrogenaza; 4-hydroxybutyryl CoA:axetyl-CoA transferaza và rượu dehydrogenaza; 4-hydroxybutyryl CoA:axetyl-CoA transferaza và aldehyt/rượu dehydrogenaza, 4-aminobutyrat-CoA transferaza và 4-aminobutyryl-CoA transaminaza; 4-aminobutyrat kinaza và 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin) và tổ hợp enzym tương tự. Do đó, được hiểu rằng tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp có thể được chứa trong vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế. Tương tự, được hiểu rằng tổ hợp bất kỳ của ba hoặc nhiều enzym tham gia vào quá trình sản sinh có thể được chứa trong vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế, ví

dụ, 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, alpha-ketoglutarat decarboxylaza và 4-hydroxybutyryl CoA:axetyl-CoA transferaza; 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza; 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, 4-hydroxybutyryl CoA:axetyl-CoA transferaza và aldehyt dehydrogenaza; 4-hydroxybutyryl CoA:axetyl-CoA transferaza, aldehyt dehydrogenaza và rượu dehydrogenaza; butyrat kinaza, phosphotransbutyrylaza và aldehyt/rượu dehydrogenaza; 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza, 4-aminobutyryl-CoA reductaza và 4-amino butan-1-ol transaminaza; 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza và 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza và hỗn hợp enzym tương tự. Tương tự, tổ hợp bất kỳ của bốn, năm hoặc nhiều enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp như được bộc lộ trong sáng chế có thể được chứa trong vi sinh vật không có trong tự nhiên theo sáng chế, như mong muốn, miễn là tổ hợp các enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp mong muốn dẫn đến quá trình sản sinh sản phẩm mong muốn tương ứng.

Các vi sinh vật không có trong tự nhiên bất kỳ được mô tả trong sáng chế có thể được nuôi cấy để sản sinh và/hoặc tiết ra các sản phẩm sinh tổng hợp theo sáng chế. Ví dụ, các vi sinh vật sản sinh 4-HB có thể được nuôi cấy để sinh tổng hợp 4-HB. Hợp chất 4-HB có thể được phân lập hoặc xử lý như được mô tả dưới đây để tạo ra GBL, THF và/hoặc BDO. Tương tự, các vi sinh vật sản sinh BDO có thể được nuôi cấy để sinh tổng hợp BDO. Hợp chất BDO có thể được phân lập hoặc tiếp tục xử lý để tổng hợp hóa học nhóm hợp chất BOD, như được bộc lộ trong sáng chế.

Môi trường nuôi cấy có thể bao gồm, ví dụ, nguồn carbohydrat bất kỳ có thể cung cấp nguồn cacbon cho vi sinh vật không có trong tự nhiên. Các nguồn này bao gồm, ví dụ, các đường như glucoza, sucroza, xyloza, arabinoza, galactoza, mannoza, fructoza và tinh bột. Các nguồn carbohydrat khác bao gồm, ví dụ, các nguyên liệu và sinh khối có thể tái tạo được. Ví dụ về các loại sinh khối có thể sử dụng làm nguyên liệu trong phương pháp theo sáng chế bao gồm sinh khối xenluloza, sinh khối hemixenluloza và nguyên liệu lignin hoặc các phần nguyên liệu. Các nguyên liệu sinh khối này chứa, ví dụ, các cơ chất carbohydrat hữu ích làm nguồn cacbon như glucoza, sucroza, xyloza, arabinoza, galactoza, mannoza, fructoza và tinh bột. Dựa trên các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các nguyên liệu và sinh khối có thể tái tạo được khác với các nguyên liệu và sinh khối được bộc lộ nêu

trên cũng có thể được sử dụng để nuôi cấy các vi sinh vật theo sáng chế để sản sinh 4-HB hoặc BDO và các hợp chất khác theo sáng chế.

Ngoài ra, dựa trên các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng vi sinh vật không có trong tự nhiên có thể được tạo ra mà tiết ra các hợp chất đã được sinh tổng hợp theo sáng chế khi được sinh trưởng trên nguồn cacbon như carbohydrat. Các hợp chất này bao gồm, ví dụ, 4-HB, BDO và các chất chuyển hóa trung gian trong quá trình sản sinh 4-HB, quá trình sản sinh BDO và/hoặc các quá trình sản sinh 4-HB và BDO kết hợp. Tất cả những gì cần thiết là tạo ra được một hoặc nhiều hoạt tính enzym được thể hiện trên Fig.1 để thu được quá trình sinh tổng hợp hợp chất hoặc hợp chất trung gian mong muốn bao gồm, ví dụ, bao gồm một số hoặc toàn bộ các quá trình sinh tổng hợp 4-HB và/hoặc BDO. Do đó, sáng chế đề xuất vi sinh vật không có trong tự nhiên tiết ra 4-HB khi được sinh trưởng trên carbohydrat, tiết ra BDO khi được sinh trưởng trên carbohydrat và/hoặc tiết ra chất chuyển hóa trung gian bất kỳ được thể hiện trên Fig.1 khi được sinh trưởng trên carbohydrat. Các vi sinh vật sản sinh BDO theo sáng chế có thể bắt đầu quá trình tổng hợp từ, ví dụ, suxinat, suxinyl-CoA, alpha-ketogluterat, suxinic semialdehyt, axit 4-hydroxybutanoic, 4-hydroxybutyrylphosphat, 4-hydroxybutyryl-CoA (4-hydroxybutyryl-CoA) và/hoặc 4-hydroxybutyraldehyt.

Theo một số phương án, các điều kiện nuôi cấy bao gồm các điều kiện lưu giữ hoặc sinh trưởng kỵ khí hoặc gần như kỵ khí. Ví dụ về các điều kiện kỵ khí đã được mô tả trước đây và được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Ví dụ về các điều kiện kỵ khí cho các quy trình lên men được mô tả trong các ví dụ dưới đây. Điều kiện bất kỳ này có thể được sử dụng với các vi sinh vật không có trong tự nhiên cũng như các điều kiện kỵ khí khác đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Dưới các điều kiện kỵ khí này, các vi sinh vật sản sinh 4-HB và BDO có thể tổng hợp monome 4-HB và BDO tương ứng, ở nồng độ bên trong tế bào nằm trong khoảng từ 5mM đến 10mM hoặc cao hơn cũng như tất cả các nồng độ khác đã được bộc lộ trước đó.

Một số hợp chất sau đó cũng có thể được tạo thành trong vi sinh vật không có trong tự nhiên sản sinh 4-HB và BDO theo sáng chế. Đối với vi sinh vật sản sinh 4-HB theo sáng chế, 4-HB dạng monome và GBL tồn tại ở trạng thái cân bằng trong môi trường nuôi

cấy. Quá trình biến đổi 4-HB thành GBL có thể được thực hiện một cách hiệu quả, ví dụ, bằng cách nuôi các vi sinh vật này trong môi trường pH axit. Độ pH thấp hơn hoặc bằng 7,5, đặc biệt là ở độ pH bằng hoặc thấp hơn 5,5, biến đổi tự nhiên 4-HB thành GBL.

GBL thu được có để được phân tách ra khỏi 4-HB và các thành phần khác có trong môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng nhiều phương pháp đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Các phương pháp phân tách này bao gồm, ví dụ, các quy trình chiết xuất được bộc lộ trong các ví dụ của sáng chế cũng như các phương pháp bao gồm chiết lỏng-lỏng liên tục, làm bay hơi qua màng, lọc qua màng, phân tách qua màng, thẩm thấu ngược, thẩm tích, chưng cất, kết tinh, ly tâm, lọc kiểu chiết, sắc ký trao đổi ion, sắc ký loại cỡ, sắc ký hấp thụ và siêu lọc. Tất cả các phương pháp nêu trên đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. GBL phân tách được có thể tiếp tục được tinh chế, ví dụ, bằng phương pháp chưng cất.

Một hợp chất khác sau đó có thể được sản sinh từ vi sinh vật không có trong tự nhiên sản sinh 4-HB theo sáng chế bao gồm, ví dụ, BDO. Ví dụ, hợp chất này có thể được tổng hợp bằng cách hydro hóa hóa học GBL. Các phản ứng hydro hóa hóa học đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Ví dụ về một quy trình bao gồm phản ứng khử hóa học 4-HB và/hoặc GBL hoặc hỗn hợp hai thành phần này thu được từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng chất xúc tác hydro hóa đồng nhất hoặc không đồng nhất cùng với khí hydro, hoặc tác nhân khử gốc hydrua được sử dụng theo tỷ lệ hợp thức hoặc mang tính chất xúc tác, để tổng hợp 1,4-butandiol.

Các quy trình khác đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này đều có giá trị ứng dụng tương tự cho phản ứng hóa học nêu trên và bao gồm, ví dụ, WO số 82/03854 (Bradley, et al.), mô tả quá trình phân giải hydro gama-butyrolacton trong pha hơi với chất xúc tác đồng oxit và kẽm oxit. Patent Anh số 1,230,276, mô tả quá trình hydro hóa gama-butyrolacton bằng cách sử dụng chất xúc tác đồng oxit-crôm oxit. Quá trình hydro hóa được thực hiện trong pha lỏng. Các phản ứng hỗn hợp này cũng được mô tả là có áp suất thiết bị phản ứng toàn phần cao. Áp suất riêng phần của chất phản ứng và sản phẩm trong các thiết bị phản ứng cao hơn các điểm ngưng tụ tương ứng. Patent Anh số 1,314,126, mô tả quá trình hydro hóa gama-butyrolacton trong pha lỏng với chất xúc tác niken-coban-thori oxit. Các phản ứng hỗn hợp này cũng được mô tả là có áp suất toàn phần cao và áp

suất riêng phần của một thành phần cao hơn điểm ngưng tụ tương ứng của thành phần đó. Patent Anh số 1,344,557, mô tả quá trình hydro hóa gama-butyrolacton trong pha lỏng với chất xúc tác đồng oxit-crôm oxit. Pha hơi hoặc pha hỗn hợp chứa hơi được cho là thích hợp trong một số trường hợp. Thiết bị phản ứng hình ống dòng liên tục được minh họa sử dụng áp suất thiết bị phản ứng toàn phần cao. Patent Anh số 1,512,751, mô tả quá trình hydro hóa gama-butyrolacton thành 1,4-butandiol trong pha lỏng với chất xúc tác đồng oxit-crôm oxit. Các phản ứng hỗn hợp được mô tả là có áp suất thiết bị phản ứng toàn phần cao và, mà có thể xác định được, áp suất riêng phần của chất phản ứng và sản phẩm cao hơn các điểm ngưng tụ tương ứng. Patent Mỹ số 4,301,077, mô tả quá trình hydro hóa gama-butyrolacton thành 1,4-butandiol với chất xúc tác Ru-Ni-Co-Zn. Phản ứng này có thể được thực hiện trong pha lỏng hoặc khí hoặc trong pha khí-lỏng hỗn hợp. Ví dụ điển hình là các phản ứng pha lỏng dòng liên tục ở áp suất thiết bị phản ứng toàn phần cao và năng suất thiết bị phản ứng tương đối thấp. Patent Mỹ số 4,048,196, mô tả quá trình sản sinh 1,4-butandiol bằng cách hydro hóa trong pha lỏng gama-butyrolacton với chất xúc tác đồng oxit-kẽm oxit. Ví dụ điển hình khác là thiết bị phản ứng hình ống dòng liên tục hoạt động ở áp suất thiết bị phản ứng toàn phần cao và áp suất riêng phần của chất phản ứng và sản phẩm cao. Patent Mỹ số 4,652,685, mô tả quá trình hydro hóa lacton thành glycol.

Hợp chất tạo ra sau đó khác có thể được sản sinh từ vi sinh vật sản sinh 4-HB theo sáng chế bao gồm, ví dụ, THF. Ví dụ, hợp chất này có thể được tổng hợp bằng cách hydro hóa hóa học GBL. Ví dụ một quy trình đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này có thể ứng dụng để biến đổi GBL thành THF bao gồm, ví dụ, quá trình khử hóa học 4-HB và/hoặc GBL hoặc hỗn hợp hai thành phần này thu được từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng chất xúc tác hydro hóa đồng nhất hoặc không đồng nhất cùng với khí hydro, hoặc tác nhân khử gốc hydrua được sử dụng theo tỷ lệ hợp thức hoặc mang tính chất xúc tác, để tổng hợp tetrahydrofuran. Các quy trình khác đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này đều có giá trị ứng dụng tương tự nhau cho phản ứng hóa học nêu trên và bao gồm, ví dụ, Patent Mỹ số 6,686,310, mô tả các chất xúc tác hydro hóa có diện tích bề mặt lớn được điều chế theo phương pháp phun mù. Các quá trình khử axit maleic thành tetrahydrofuran (THF) và 1,4-butandiol (BDO) và khử gama butyrolacton thành tetrahydrofuran và 1,4-butandiol cũng được mô tả.

Các điều kiện nuôi cấy có thể bao gồm, ví dụ, các quy trình nuôi cấy lỏng cũng như quy trình lên men và các quy trình nuôi cấy quy mô lớn khác. Như tiếp tục được mô tả trong các ví dụ dưới đây, năng suất đặc biệt hữu ích của các sản phẩm sinh tổng hợp theo sáng chế có thể thu được dưới các điều kiện nuôi cấy kỵ khí hoặc gần như kỵ khí.

Các phương pháp tinh chế và/hoặc định lượng thích hợp để đánh giá quá trình sản sinh 4-HB hoặc BDO có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến. Các bản sao thích hợp như các chủng nuôi cấy lặp lại ba lần có thể được sinh trưởng đối với mỗi chủng được thiết kế để được thử nghiệm. Ví dụ, quá trình hình thành sản phẩm và sản phẩm phụ trong vật chủ sản sinh được thiết kế có thể được kiểm soát. Sản phẩm cuối cùng và các hợp chất trung gian và các hợp chất hữu cơ khác, có thể được phân tích bằng các phương pháp như HPLC (sắc ký lỏng hiệu năng cao), GC-MS (sắc ký khí ghép khối phổ) và LC-MS (sắc ký lỏng ghép khối phổ) hoặc các phương pháp phân tích thích hợp khác sử dụng các quy trình thông dụng đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Quá trình giải phóng của sản phẩm vào canh trường lên men cũng có thể được định tính với dịch nổi của môi trường nuôi cấy. Các sản phẩm phụ và glucoza dư có thể được định lượng bằng HPLC ví dụ, bằng cách sử dụng bộ dò khúc xạ đối với glucoza và các rượu và bộ dò tử ngoại khả kiến (UV) đối với các axit hữu cơ (Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 90:775-779 (2005)), hoặc các phương pháp phát hiện và định lượng thích hợp khác đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Hoạt tính enzym hoặc protein riêng biệt từ các trình tự ADN ngoại sinh cũng có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này.

Sản phẩm 4-HB hoặc BDO có thể được phân tách ra khỏi các thành phần còn lại trong môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Các phương pháp phân tách này bao gồm, ví dụ, các phương pháp chiết xuất cũng như các phương pháp bao gồm chiết lỏng-lỏng liên tục, làm bay hơi qua màng, lọc qua màng, phân tách qua màng, thẩm thấu ngược, thẩm tích, chưng cất, kết tinh, ly tâm, lọc kiểu chiết, sắc ký trao đổi ion, sắc ký loại cỡ, sắc ký hấp thụ và siêu lọc. Tất cả các phương pháp nêu trên đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất 4-HB. Phương pháp này bao gồm quá trình lên men vi sinh vật không có trong tự nhiên có quá trình sinh tổng hợp axit 4-

hydroxybutanoic (4-HB), quá trình này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, glutamat:suxinic semialdehyt transaminaza, a-ketoglutarat decarboxylaza hoặc glutamat glutamat decarboxylaza dưới các điều kiện gần như kỵ khí trong khoảng thời gian đủ để sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic monome (4-HB), phương pháp này bao gồm quá trình lên men bổ sung dinh dưỡng và phân tách theo mẻ; quá trình lên men bổ sung dinh dưỡng theo mẻ và phân tách liên tục, hoặc quá trình lên men và phân tách liên tục.

Các quá trình hydro hóa hóa học và nuôi cấy được mô tả nêu trên cũng có thể được ứng dụng trên quy mô lớn và sinh trưởng liên tục để sản xuất 4-HB, GBL, BDO và/hoặc THF. Ví dụ về các quá trình nuôi cấy sinh trưởng bao gồm, ví dụ, quá trình lên men bổ sung dinh dưỡng và phân tách theo mẻ; quá trình lên men bổ sung dinh dưỡng theo mẻ và phân tách liên tục, hoặc quá trình lên men và phân tách liên tục. Tất cả các quá trình này đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Sử dụng các vi sinh vật sản sinh 4-HB cho phép đồng thời sinh tổng hợp 4-HB và biến đổi hóa học thành GBL, BDO và/hoặc THF bằng cách sử dụng đồng thời các quá trình hydro hóa nêu trên với các phương pháp nuôi cấy liên tục như quá trình lên men. Các quá trình hydro hóa khác cũng đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này và đều có thể ứng dụng cho các phương pháp theo sáng chế.

Các quy trình lên men là đặc biệt hữu ích đối với quá trình sinh tổng hợp sản lượng thương mại của 4-HB và/hoặc BDO. Nói chung và đối với các quá trình nuôi cấy không liên tục, quá trình sản sinh liên tục và/hoặc gần như liên tục của 4-HB hoặc BDO sẽ bao gồm quá trình nuôi cấy vi sinh vật sản sinh 4-HB hoặc BDO không có trong tự nhiên theo sáng chế trên môi trường và các chất dinh dưỡng đủ để duy trì và/hoặc gần như duy trì quá trình sinh trưởng ở pha logarit. Quá trình nuôi cấy liên tục trong các điều kiện này có thể bao gồm, ví dụ, 1 ngày, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 ngày hoặc lâu hơn. Ngoài ra, quá trình nuôi cấy liên tục này có thể bao gồm 1 tuần, 2, 3, 4 hoặc 5 hoặc nhiều tuần và lên đến một vài tháng. Theo cách khác, các vi sinh vật theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong vài giờ, nếu thích hợp đối với ứng dụng cụ thể. Được hiểu rằng các điều kiện nuôi cấy liên tục và/hoặc gần như liên tục cũng có thể bao gồm toàn bộ các khoảng thời gian nằm trong các khoảng thời gian đã được minh họa này. Cũng được hiểu rằng thời gian nuôi cấy vi sinh

vật theo sáng chế là khoảng thời gian đủ để sản sinh được sản phẩm với số lượng đủ cho mục đích mong muốn.

Các quá trình lên men đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Nói tóm lại, các quá trình lên men để sinh tổng hợp 4-HB, BDO hoặc các sản phẩm thu được từ 4-HB khác theo sáng chế có thể được sử dụng, ví dụ, trong quá trình lên men bổ sung dinh dưỡng và phân tách theo mẻ; quá trình lên men bổ sung dinh dưỡng theo mẻ và phân tách liên tục, hoặc quá trình lên men và phân tách liên tục. Ví dụ về các quá trình lên men theo mẻ và liên tục đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này cũng được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

Ngoài các quá trình lên men nêu trên sử dụng các vi sinh vật sản sinh 4-HB hoặc BDO theo sáng chế để sản sinh liên tục số lượng đáng kể 4-HB monome và BDO tương ứng, các vi sinh vật sản sinh 4-HB ví dụ, cũng có thể được trải qua các quá trình tổng hợp hóa học như được mô tả trước đó để biến đổi hóa học 4-HB monome thành, ví dụ, GBL, BDO và/hoặc THF. Ví dụ, các vi sinh vật sản sinh BDO có thể được trải qua đồng thời với các quá trình tổng hợp hóa học như được mô tả trước đó để biến đổi hóa học BDO thành, ví dụ, THF, GBL, pyrolidon và/hoặc nhóm các hợp chất BDO khác. Ngoài ra, sản phẩm của các vi sinh vật sản sinh 4-HB và BDO có thể được phân tách ra khỏi môi trường lên men và sau đó trải qua quá trình biến đổi hóa học, như được bộc lộ trong sáng chế.

Nói tóm lại, quá trình hydro hóa GBL trong canh trường lên men có thể được thực hiện như được mô tả bởi Frost et al., *Biotechnology Progress* 18: 201-211 (2002). Quá trình hydro hóa khác trong canh trường lên men bao gồm, ví dụ, các phương pháp được mô tả ví dụ, trong, patent Mỹ số 5,478,952. Phương pháp này cũng được bộc lộ trong các ví dụ dưới đây.

Do đó, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất gama-butyrolacton (GBL), tetrahydrofuran (THF) hoặc 1,4-butandiol (BDO). Phương pháp này bao gồm quá trình lên men vi sinh vật không có trong tự nhiên có các quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic (4-HB) và/hoặc 1,4-butandiol (BDO), quá trình này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, suxinyl-CoA syntetaza, suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, 4-hydroxybutyrat:CoA transferaza, glutamat:suxinic

semialdehyt transaminaza, alpha-ketoglutarat decarboxylaza, glutamat decarboxylaza, 4-hydroxybutanoat kinaza, phosphotransbutyrylaza, 1,4-butandiol semialdehyt dehydrogenaza không phụ thuộc CoA, 1,4-butandiol semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, 1,4-butandiol rượu dehydrogenaza không phụ thuộc CoA hoặc 1,4-butandiol rượu dehydrogenaza phụ thuộc CoA, dưới các điều kiện gần như kỵ khí trong khoảng thời gian đủ để sinh tổng hợp 1,4-butandiol (BDO), GBL hoặc THF, quá trình lên men bao gồm quá trình lên men bổ sung dinh dưỡng và phân tách theo mẻ; quá trình lên men bổ sung dinh dưỡng theo mẻ và phân tách liên tục, hoặc quá trình lên men và phân tách liên tục.

Ngoài quá trình sinh tổng hợp 4-HB, BDO và các sản phẩm khác theo sáng chế như được mô tả trong sáng chế, các vi sinh vật không có trong tự nhiên và các phương pháp theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong các hỗn hợp khác nhau và với các vi sinh vật và phương pháp khác đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này để thu được quá trình sinh tổng hợp sản phẩm theo các con đường khác. Ví dụ, một quá trình thay thế để sản sinh BDO khác với việc sử dụng các vi sinh vật sản sinh 4-HB và các bước hóa học hoặc khác với việc sử dụng vi sinh vật sản sinh BDO trực tiếp thông qua việc sử dụng thêm một vi sinh vật khác có khả năng biến đổi 4-HB hoặc sản phẩm 4-HB được minh họa trong sáng chế thành BDO.

Một quy trình như vậy bao gồm, ví dụ, quá trình lên men vi sinh vật sản sinh 4-HB theo sáng chế để sản sinh 4-HB, như được mô tả nêu trên và dưới đây. Sau đó, 4-HB có thể được sử dụng làm cơ chất cho vi sinh vật thứ hai mà biến đổi 4-HB thành, ví dụ, BDO, GBL và/hoặc THF. 4-HB có thể được bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy khác của vi sinh vật thứ hai hoặc môi trường nuôi cấy ban đầu của vi sinh vật sản sinh 4-HB có thể được làm tiêu hết các vi sinh vật này ví dụ, bằng cách phân tách tế bào và sau đó, bổ sung vi sinh vật thứ hai vào canh trường lên men có thể được sử dụng để sản sinh sản phẩm cuối cùng mà không cần quá trình tinh chế trung gian. Một ví dụ về vi sinh vật thứ hai có khả năng sử dụng về mặt sinh hóa axit 4-HB làm cơ chất để biến đổi thành BDO, ví dụ, là *Clostridium acetobutylicum* (tham khảo, ví dụ, Jewell et al., *Current Microbiology*, 13:215-19 (1986)).

Theo các phương án khác, các vi sinh vật không có trong tự nhiên và các phương pháp theo sáng chế có thể được kết hợp theo nhiều quá trình thay thế khác nhau để thu được quá trình sinh tổng hợp, ví dụ, 4-HB và/hoặc BDO như đã được mô tả. Theo các phương án này, các quá trình sinh tổng hợp đối với sản phẩm mong muốn theo sáng chế có thể được tách biệt trong các vi sinh vật khác nhau và các vi sinh vật khác nhau này có thể được nuôi cấy đồng thời để sản sinh sản phẩm cuối cùng. Trong một quá trình sinh tổng hợp như vậy, sản phẩm của một vi sinh vật là cơ chất cho vi sinh vật thứ hai cho đến khi sản phẩm cuối cùng được sinh tổng hợp. Ví dụ, quá trình sinh tổng hợp BDO có thể được thực hiện như được mô tả trước đó bằng cách tạo ra vi sinh vật có các quá trình sinh tổng hợp để biến đổi một chất trung gian của quá trình thành một chất trung gian khác của quá trình hoặc sản phẩm, ví dụ, cơ chất như suxinat nội sinh thông qua 4-HB thành sản phẩm BDO cuối cùng. Theo cách khác, BDO cũng có thể được sinh tổng hợp từ các vi sinh vật thông qua quá trình nuôi cấy đồng thời hoặc lên men đồng thời sử dụng hai vi sinh vật trong cùng bình nuôi cấy. Vi sinh vật thứ nhất là vi sinh vật sản sinh 4-HB có các gen để sản sinh 4-HB từ axit suxinic và và vi sinh vật thứ hai là vi sinh vật sản sinh BDO có các gen để biến đổi 4-HB thành BDO.

Dựa trên các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng một loạt các tổ hợp và hoán vị hiện có đối với các vi sinh vật không có trong tự nhiên và các phương pháp theo sáng chế cùng với các vi sinh vật khác và quá trình nuôi cấy đồng thời vi sinh vật không có trong tự nhiên khác có các quá trình thay thế và kết hợp với các quá trình hóa học và/hoặc sinh hóa khác đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này để sản sinh 4-HB, BDO, GBL và THF theo sáng chế.

Để tạo ra các vi sinh vật sản sinh tốt hơn, mô hình chuyển hóa có thể được sử dụng để tối ưu hóa các điều kiện sinh trưởng. Mô hình này cũng có thể được sử dụng để thiết kế các bất hoạt gen mà tối ưu hóa hơn nữa việc sử dụng quá trình này (tham khảo, ví dụ, các đơn yêu cầu cấp patent Mỹ US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 và US 2004/0009466 và patent Mỹ số 7,127,379). Phân tích mô hình cho phép dự báo chắc chắn hiệu quả trên sinh trưởng tế bào của quá trình chuyển vị chuyển hóa theo hướng sản sinh BDO hiệu quả hơn.

Một phương pháp thuật toán để xác định và thiết kế các biến đổi chuyển hóa có lợi cho quá trình sinh tổng hợp sản phẩm mong muốn là chương trình thuật toán OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)). OptKnock là chương trình mô phỏng và tạo mô hình chuyển hóa đề xuất chiến lược loại bỏ hoặc phá vỡ gen mà tạo ra các vi sinh vật ổn định về mặt di truyền sản sinh quá mức sản phẩm đích. Đặc biệt là, chương trình này khảo sát toàn bộ hệ thống chuyển hóa và/hoặc sinh hóa của vi sinh vật để đề xuất các kỹ thuật di truyền mà tác động mạnh đến quá trình sinh hóa mong muốn để trở thành sản phẩm phụ bắt buộc của quá trình sinh trưởng tế bào. Bằng cách liên hợp quá trình sản sinh sinh hóa với quá trình sinh trưởng tế bào thông qua các quá trình loại bỏ gen có định hướng vị trí hoặc phá vỡ gen chức năng khác, sức ép chọn lọc sinh trưởng tác động mạnh đối với các chủng được thiết kế sau khoảng thời gian dài trong thiết bị phản ứng sinh học dẫn đến các cải thiện về hiệu suất là kết quả của quá trình tổng hợp sinh hóa liên hợp sinh trưởng bắt buộc. Cuối cùng, khi các quá trình loại bỏ gen được tạo ra, khả năng các chủng được thiết kế quay trở lại trạng thái tự nhiên của chúng là không đáng kể do các gen được chọn theo phương pháp OptKnock là để được loại bỏ hoàn toàn từ bộ gen. Do đó, phương pháp thuật toán này có thể được sử dụng để hoặc xác định các quá trình thay thế mà tạo ra quá trình sinh tổng hợp sản phẩm mong muốn hoặc được sử dụng liên hợp với các vi sinh vật không có trong tự nhiên để tiếp tục tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp sản phẩm mong muốn.

Nói tóm lại, OptKnock là thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế để chỉ phương pháp và hệ thống thuật toán để thiết kế mô hình chuyển hóa nội bào. Chương trình OptKnock đề cập đến hệ thống các mô hình và phương pháp mà liên hợp các điều kiện ràng buộc cụ thể vào các mô hình phân tích cân bằng chu trình (flux balance analysis - FBA). Các điều kiện ràng buộc này bao gồm, ví dụ, thông tin động học về chất, thông tin điều hòa về chất và/hoặc dữ liệu thử nghiệm vi chuỗi ADN. Chương trình OptKnock tính toán các giải pháp cho các vấn đề chuyển hóa khác nhau, ví dụ, bằng cách cố định các giới hạn chu trình thu được thông qua các mô hình cân bằng chu trình và sau đó thăm dò các giới hạn hiệu suất của hệ thống chuyển hóa khi có sự thêm gen hoặc loại bỏ gen. Chương trình thuật toán OptKnock cho phép tạo ra các công thức mô hình mà có khả năng truy vấn hiệu quả các giới hạn hiệu suất của hệ thống chuyển hóa và đề xuất các phương pháp để giải quyết vấn đề lập trình tuyến tính nguyên thể-phối hợp thu được. Phương pháp tạo mô

hình và mô phỏng quá trình chuyển hóa được sử dụng trong sáng chế để chỉ phương pháp OptKnock được mô tả trong, ví dụ, công bố đơn xin cấp patent của Mỹ số 2002/0168654, nộp ngày 10 tháng 1 năm 2002, đơn quốc tế số PCT/US02/00660, nộp ngày 10 tháng 1 năm 2002 và đơn xin cấp patent Mỹ số 11/891,602, nộp ngày 10/08/2007,

Phương pháp thuật toán khác để xác định và thiết kế các biến đổi chuyển hóa có lợi cho quá trình sinh tổng hợp sản phẩm là hệ thống tạo mô hình và mô phỏng chuyển hóa được gọi là SimPheny®. Hệ thống và phương pháp thuật toán này được mô tả trong, ví dụ, công bố đơn xin cấp patentMỹ số 2003/0233218, nộp này 14/06/2002 và đơn quốc tế số PCT/US03/18838, 13/06/2003. SimPheny® là hệ thống thuật toán có thể được sử dụng để tạo ra mô hình hệ thống *in silico* và mô phỏng chu trình khối lượng, năng lượng hoặc điện tích thông qua các phản ứng hóa học của hệ thống sinh học để xác định khoảng trống giải pháp chứa toàn bộ các chức năng có thể có và bất kỳ của các phản ứng hóa học trong hệ thống chuyển hóa, từ đó xác định một loạt các quá trình hoạt động được cho phép của hệ thống sinh học. Phương pháp tiếp cận này được sử dụng để chỉ phương pháp thiết kế mô hình dựa trên các điều kiện ràng buộc do khoảng trống giải pháp được xác định từ các điều kiện ràng buộc như mô hình hợp thức đã biết bao gồm các phản ứng cũng như quá trình nhiệt lực học phản ứng và các điều kiện ràng buộc hiệu suất liên quan đến các chu trình tối đa thông qua các phản ứng. Khoảng trống này được xác định từ các điều kiện ràng buộc có thể được kiểm chứng để xác định các khả năng kiểu hình và trạng thái của hệ thống sinh học hoặc các thành phần sinh hóa của hệ thống này.

Các phương pháp tiếp cận thuật toán này là phù hợp với điều kiện thực tế sinh học bởi vì các hệ thống sinh học là linh hoạt và có thể thu được kết quả tương tự theo nhiều phương thức khác nhau. Các hệ thống sinh học này được thiết kế thông qua các cơ chế tiến hóa mà đã được giới hạn bởi các điều kiện ràng buộc cơ bản mà tất cả các cơ thể sống phải đối mặt. Do đó, nói chung phương pháp tạo mô hình dựa trên các điều kiện ràng buộc bao gồm các điều kiện thực tế này. Hơn nữa, khả năng tiếp tục tác động mạnh hơn nữa các giới hạn đối với mô hình hệ thống thông qua việc cố định các điều kiện ràng buộc dẫn đến sự giảm kích thước của khoảng trống giải pháp, do đó cải thiện độ chính xác mà hiệu suất sinh lý hoặc kiểu hình có thể được dự đoán.

Dựa trên các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể sử dụng các chương trình thuật toán khác nhau để tạo mô hình và mô phỏng quá trình chuyển hóa để thiết kế và thực hiện quá trình sinh tổng hợp hợp chất mong muốn ở các vi sinh vật chủ. Các phương pháp tạo mô hình và mô phỏng quá trình chuyển hóa này bao gồm, ví dụ, các hệ thống thuật toán được minh họa nêu trên như SimPheny® và OptKnock. Để minh họa sáng chế, một số phương pháp được mô tả trong sáng chế kết hợp tham khảo chương trình thuật toán OptKnock để tạo mô hình và mô phỏng quá trình chuyển hóa. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được phương thức để sử dụng quá trình nhận diện, thiết kế và thực hiện các biến đổi chuyển hóa sử dụng chương trình OptKnock cho các chương trình thuật toán mô phỏng và tạo mô hình quá trình chuyển hóa khác và các phương pháp đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này.

Các phương pháp được mô tả nêu trên sẽ đề xuất một tập hợp phản ứng chuyển hóa để phá vỡ. Việc loại bỏ từng phản ứng trong tập hợp phản ứng chuyển hóa này hoặc cải biến chuyển hóa có thể tạo ra sản phẩm mong muốn dưới dạng sản phẩm bắt buộc trong pha sinh trưởng của vi sinh vật. Bởi vì các phản ứng này đã biết, giải pháp đối với vấn đề OptKnock hai mức này cũng sẽ đề xuất gen hoặc các gen liên quan mã hóa một hoặc nhiều enzym xúc tác từng phản ứng trong tập hợp các phản ứng này. Nói chung, việc nhận dạng tập hợp các phản ứng và các gen tương ứng mã hóa cho các enzym của chúng tham gia vào mỗi phản ứng này là quá trình tự động, được thực hiện thông qua mối liên hệ của các phản ứng với dữ liệu phản ứng có mối tương quan giữa các enzym và các gen mã hóa tương ứng.

Khi được xác định, tập hợp phản ứng cần được phá vỡ để thu được quá trình tổng hợp sản phẩm mong muốn được thực hiện trong tế bào hoặc vi sinh vật đích bằng cách phá vỡ chức năng của ít nhất một gen mã hóa từng phản ứng trong tập hợp này. Một phương pháp đặc biệt hữu ích để thu được quá trình phá vỡ chức năng của tập hợp phản ứng này là bằng cách loại bỏ từng gen mã hóa. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, cũng có thể có lợi để phá vỡ phản ứng này bằng các bất thường di truyền khác bao gồm, ví dụ, đột biến, loại bỏ các vùng điều hòa như các trình tự tự khởi đầu hoặc các vị trí liên kết cis đối với các yếu tố điều hòa, hoặc bằng cách cắt cụt trình tự mã hóa ở một số vị trí bất kỳ. Các bất thường sau cùng này, dẫn đến loại bỏ ít hơn tổng số tập hợp gen có thể hữu ích, ví

dụ, khi đánh giá nhanh quá trình liên hợp sản phẩm được mong muốn hoặc khi quá trình phục hồi gen ít có khả năng xảy ra.

Để xác định các giải pháp bổ sung hiệu quả đối với vấn đề OptKnock hai mức được mô tả nêu trên mà tiếp tục tạo ra các tập hợp phản ứng để phá vỡ hoặc các cải biến chuyển hóa mà có thể tạo ra quá trình sinh tổng hợp, bao gồm quá trình sinh tổng hợp liên hợp sinh trưởng sản phẩm mong muốn, phương pháp tối ưu, được gọi là phương pháp loại bỏ nghiệm nguyên, có thể được thực hiện. Phương pháp này được thực hiện bằng cách giải quyết lặp lại vấn đề OptKnock được minh họa nêu trên kết hợp với điều kiện ràng buộc bổ sung được sử dụng để chỉ phương pháp loại bỏ nghiệm nguyên tại mỗi độ lặp lại. Các điều kiện ràng buộc loại bỏ nghiệm nguyên ngăn ngừa hiệu quả quy trình giải pháp từ việc chọn lọc tập hợp phản ứng tương tự chính xác được xác định theo quá trình lặp lại trước đó mà liên hợp bắt buộc quá trình sinh tổng hợp sản phẩm với quá trình sinh trưởng. Ví dụ, nếu đột biến chuyển hóa liên hợp sinh trưởng được xác định trước đó chỉ rõ các phản ứng 1, 2 và 3 để phá vỡ, sau đó các điều kiện ràng buộc tiếp theo ngăn ngừa các phản ứng tương tự đồng thời xem xét các giải pháp tiếp theo. Phương pháp loại bỏ nghiệm nguyên is đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này và được mô tả trong, ví dụ, Burgard et al., *Biotechnol. Prog.* 17:791-797 (2001). Đối với tất cả các phương pháp được mô tả trong sáng chế tham khảo việc sử dụng chúng kết hợp với chương trình thuật toán OptKnock để mô phỏng và tạo mô hình quá trình chuyển hóa, phương pháp loại bỏ nghiệm nguyên làm giảm phần dư trong phân tích thuật toán lặp lại cũng có thể được sử dụng với các chương trình thuật toán khác đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này bao gồm, ví dụ, SimPheny®.

Các phương pháp được minh họa trong sáng chế cho phép tạo ra các tế bào và vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp sản phẩm mong muốn, bao gồm việc liên hợp bắt buộc quá trình tổng hợp sản phẩm sinh hóa mục tiêu với quá trình sinh trưởng của tế bào hoặc vi sinh vật được thiết kế để chứa các biến đổi di truyền đã được xác định. Do đó, các phương pháp thuật toán được mô tả trong sáng chế cho phép xác định và thực hiện các đột biến chuyển hóa mà được xác định theo phương pháp in silico được chọn từ OptKnock hoặc SimPheny®. Một tập hợp các cải biến chuyển hóa có thể bao gồm, ví dụ, bổ sung một hoặc nhiều enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp và/hoặc phá vỡ chức năng

của một hoặc nhiều phản ứng chuyển hóa bao gồm, ví dụ, phá vỡ bằng quá trình loại bỏ gen.

Như được bộc lộ nêu trên, phương pháp OptKnock được phát triển dựa trên các hệ thống vi sinh vật đột biến có thể được tiến hóa theo xu hướng kiểu hình sinh trưởng tối đa được dự báo bằng thuật toán của chúng khi được trải qua thời gian quá trình chọn lọc sinh trưởng kéo dài. Nói cách khác, phương pháp tiếp cận này tận dụng khả năng tự tối ưu hóa của vi sinh vật trong các điều kiện chọn lọc khắc nghiệt. Chương trình OptKnock cho phép liệt kê đầy đủ các tổ hợp loại bỏ gen xóa mà tác động mạnh đến sự liên hợp giữa quá trình tổng hợp sinh hóa và sinh trưởng tế bào dựa trên mô hình hợp thức hệ thống. Quá trình xác định các đột biến loại bỏ phản ứng/gen tối ưu đòi hỏi giải pháp của vấn đề tối ưu hóa hai mức mà chọn lọc tập hợp phản ứng hoạt động sao cho giải pháp sinh trưởng tối ưu đối với hệ thống thu được tạo ra nhiều sản phẩm sinh hóa quan tâm (Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)).

Mô hình hợp thức *in silico* của quá trình chuyển hóa ở *E. coli* có thể được sử dụng để xác định các gen thiết yếu cho các quá trình chuyển hóa như được minh họa trước đó và được mô tả trong, ví dụ, các đơn xin cấp patent Mỹ US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 và US 2004/0009466 và patent Mỹ số 7,127,379, Như được bộc lộ trong sáng chế, chương trình thuật toán OptKnock có thể được sử dụng để xác định các gen cần loại bỏ tạo ra quá trình sản sinh liên hợp sinh trưởng sản phẩm mong muốn. Hơn nữa, giải pháp của vấn đề OptKnock hai mức chỉ đề xuất một tập hợp loại bỏ gen. Để liệt kê tất cả các giải pháp khả thi, đó là, toàn bộ các tập hợp bất hoạt gen dẫn đến sự hình thành quá trình sản sinh liên hợp sinh trưởng, kỹ thuật tối ưu hóa, tức là loại bỏ nghiệm nguyên, có thể được thực hiện. Điều này đòi hỏi phải giải quyết lặp lại vấn đề OptKnock kết hợp với điều kiện ràng buộc bổ sung được sử dụng để chỉ phương pháp loại bỏ nghiệm nguyên ở từng độ lặp lại, như được bộc lộ nêu trên.

Các phương pháp được minh họa nêu trên và tiếp tục được minh họa trong các ví dụ dưới đây cho phép tạo ra các tế bào và sinh vật mà có khả năng sinh tổng hợp, bao gồm liên hợp bắt buộc quá trình sản sinh của sản phẩm sinh hóa mục tiêu với quá trình sinh trưởng của tế bào hoặc vi sinh vật được thiết kế để mang các biến đổi di truyền đã được

xác định. Đối với vấn đề này, các biến đổi chuyển hóa đã được xác định mà tạo ra quá trình sinh tổng hợp 4-HB và 1,4-butandiol. Các chủng vinh vật được tạo cấu trúc có các biến đổi chuyển hóa đã được xác định tăng sinh tổng hợp 4-HB hoặc BDO hơn so với các vi sinh vật không được gây đột biến. Các chủng này có thể được sử dụng có lợi để sản xuất thương mại 4-HB, BDO, THF và GBL, ví dụ, trong quy trình lên men liên tục mà không trải qua quá trình chọn lọc khắc nghiệt.

Do đó, các phương pháp thuật toán được mô tả trong sáng chế có thể xác định và thực hiện các cải biến chuyển hóa mà được xác định theo phương pháp *in silico* được chọn từ OptKnock hoặc SimPheny®. Một tập hợp các cải biến chuyển hóa có thể bao gồm, ví dụ, bổ sung một hoặc nhiều enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp và/hoặc phá vỡ chức năng của một hoặc nhiều phản ứng chuyển hóa bao gồm, ví dụ, phá vỡ bằng quá trình loại bỏ gen.

Các vi sinh vật không có trong tự nhiên bất kỳ được mô tả trong sáng chế có thể được nuôi cấy để sản sinh và/hoặc tiết ra các sản phẩm sinh tổng hợp theo sáng chế. Ví dụ, các vi sinh vật sản sinh BDO có thể được nuôi cấy để sinh tổng hợp BDO.

Đối với quá trình sản sinh BDO, các chủng vi sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường có nguồn cacbon và các chất dinh dưỡng thiết yếu khác. Rất mong muốn để duy trì các điều kiện kỵ khí trong thiết bị lên men để giảm chi phí toàn bộ quá trình. Ban đầu, các điều kiện này có thể thu được, ví dụ, bằng cách sục khí nitơ vào môi trường nuôi cấy và sau đó bịt kín các bình nuôi cấy bằng vách ngăn và nắp uốn gấp. Đối với các chủng không có khả năng sinh trưởng kỵ khí, các điều kiện vi hiếu khí có thể được sử dụng bằng cách khoan thủng vách ngăn với lỗ nhỏ để thông khí hạn chế. Ví dụ về các điều kiện kỵ khí đã được mô tả trước đây và đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Ví dụ về các điều kiện hiếu khí và kỵ khí được mô tả, ví dụ, trong công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2009/0047719, nộp ngày 10/08/2007. Quá trình lên men có thể được thực hiện theo phương pháp lên men theo mẻ, lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng hoặc lên men liên tục, như được bộc lộ trong sáng chế.

Nếu muốn, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được duy trì ở độ pH mong muốn, đặc biệt là độ pH trung tính, như độ pH dao động xung quanh pH 7 bằng cách bổ sung bazơ, như NaOH hoặc các bazơ hoặc axit khác, khi cần thiết để duy trì môi trường

nuôi cấy ở độ pH mong muốn. tốc độ sinh trưởng có thể được xác định bằng cách đo mật độ quang sử dụng quang phổ kế (600nm) và tốc độ hấp thu glucoza bằng cách kiểm soát quá trình suy giảm nguồn cacbon theo thời gian.

Ngoài các nguyên liệu có thể tái tạo được như các nguyên liệu đã được mô tả nêu trên, các vi sinh vật sản sinh BDO theo sáng chế cũng có thể được cải biến để sinh trưởng trên khí đốt tổng hợp làm nguồn cacbon của nó. Theo phương án cụ thể này, một hoặc nhiều protein hoặc enzym được biểu hiện ở các vi sinh vật sản sinh BDO để tạo ra quá trình chuyển hóa để sử dụng khí đốt tổng hợp hoặc nguồn cacbon từ khí khác.

Khí đốt tổng hợp, cũng được biết đến là khí đốt tổng hợp hoặc khí than, là sản phẩm chính của quá trình khí hóa than đá và nguyên liệu cacbon như nguyên liệu sinh khối, bao gồm sản phẩm và chất thải nông nghiệp. Khí đốt tổng hợp là hỗn hợp chủ yếu bao gồm H_2 và CO và có thể thu được từ quá trình khí hóa nguồn nguyên liệu hữu cơ bất kỳ, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở than đá, dầu than đá, khí tự nhiên, sinh khối và chất thải hữu. Nói chung, quá trình khí hóa được thực hiện theo tỷ lệ nguyên liệu so với khí oxi cao. Ngoài lượng lớn H_2 và CO, khí đốt tổng hợp cũng có thể bao gồm CO_2 và các khí khác với lượng nhỏ hơn. Do đó, khí đốt tổng hợp cung cấp nguồn khí cacbon có chi phí hiệu quả như CO và, ngoài ra, CO_2.

Quá trình Wood-Ljungdahl xúc tác quá trình biến đổi CO và H_2 thành axetyl-CoA và các sản phẩm khác như axetat. Nói chung, các vi sinh vật có khả năng sử dụng CO và khí đốt tổng hợp cũng có khả năng sử dụng CO_2 và hỗn hợp CO_2/H_2 thông qua tổ hợp enzym cơ bản và các biến đổi được bao gồm bởi quá trình Wood-Ljungdahl. Quá trình biến đổi CO_2 phụ thuộc H_2 thành axetat bởi các vi sinh vật đã được ghi nhận từ lâu trước khi quá trình này được bộc lộ rằng CO cũng có thể được sử dụng bởi các vi sinh vật tương tự và các quá trình tương tự được bao gồm. Nhiều chủng acetogen đã được chứng minh là có thể sinh trưởng với sự có mặt của CO_2 và sinh tổng hợp các hợp chất này như axetat miễn là hydro có mặt để cung cấp các đương lượng khử cần thiết (tham khảo ví dụ, Drake, *Acetogensis*, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994)). Quá trình này có thể được tóm tắt theo phương trình sau:

$$2\ CO_2 + 4\ H_2 + n\ ADP + n\ Pi \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O + n\ ATP$$

Do đó, các vi sinh vật không có trong tự nhiên chứa quá trình Wood-Ljungdahl có thể sử dụng hỗn hợp CO_2 và H_2 cũng như trong quá trình sản sinh axetyl-CoA và các sản phẩm mong muốn khác.

Quá trình Wood-Ljungdahl đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này và bao gồm 12 phản ứng có thể được chia thành hai nhánh phản ứng: (1) nhánh metyl và (2) nhánh cacbonyl. Nhánh metyl biến đổi khí đốt tổng hợp metyl-tetrahydrofolat (metyl-THF) trong khi đó nhánh cacbonyl biến đổi metyl-THF thành axetyl-CoA. Các phản ứng thuộc nhánh metyl được xúc tác bởi các enzym hoặc protein sau: feredoxin oxidoreductaza, format dehydrogenaza, formyltetrahydrofolat syntetaza, metenyltetrahydrofolat xyclodehydrataza, metylentetrahydrofolat dehydrogenaza và metylentetrahydrofolat reductaza. Các phản ứng thuộc nhánh cacbonyl được xúc tác bởi các enzym hoặc protein sau: metyltetrahydrofolat:corrinoid protein metyltransferaza (ví dụ, AcsE), corrinoid sắt-lưu huỳnh protein, niken-protein liên hợp protein (ví dụ, AcsF), feredoxin, axetyl-CoA syntaza, cacbon monoxit dehydrogenaza và niken-protein liên hợp protein (ví dụ, CooC). Theo các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất của sáng chế để chèn thêm số lượng axit nucleic mã hóa đủ để tạo ra quá trình sản sinh BDO, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng thiết kế tương tự cũng có thể được thực hiện để chèn thêm ít nhất là axit nucleic mã hóa các enzym hoặc protein Wood-Ljungdahl không có ở vi sinh vật chủ. Do đó, việc chèn thêm một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa vào các vi sinh vật theo sáng chế sao cho vi sinh vật được cải biến này chứa toàn bộ quá trình Wood-Ljungdahl sẽ có khả năng sử dụng khí đốt tổng hợp.

Ngoài ra, dựa trên các dấu hiệu và chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng vi sinh vật không có trong tự nhiên có thể được tạo ra mà tiết ra các hợp chất đã được sinh tổng hợp theo sáng chế khi được sinh trưởng trên nguồn cacbon như carbohydrat. Các hợp chất này bao gồm, ví dụ, BDO và các chất chuyển hóa trung gian bất kỳ trong quá trình sản sinh BDO. Tất cả những gì cần thiết là thiết kế một hoặc nhiều hoạt tính enzym hoặc protein mông muốn để thu được quá trình sinh tổng hợp hợp chất hoặc hợp chất trung gian mong muốn bao gồm, ví dụ, bao gồm một số hoặc toàn bộ các quá trình sinh tổng hợp BDO. Do đó, sáng chế đề xuất vi sinh vật không có trong tự nhiên mà sản sinh và/hoặc tiết ra BDO khi được sinh trưởng trên carbohydrat hoặc nguồn cacbon khác và sản sinh và/hoặc tiết ra chất chuyển hóa trung

gian bất kỳ được thể hiện trong quá trình sản sinh BDO khi được sinh trưởng trên carbohydrat hoặc nguồn cacbon khác. Các vi sinh vật sản sinh BDO theo sáng chế có thể bắt đầu tổng hợp từ chất trung gian trong quá trình sản sinh BDO, như được bộc lộ trong sáng chế.

Được hiểu rằng các biến đổi mà hầu như không ảnh hưởng đến hoạt tính trong các phương án khác nhau của sáng chế cũng được bao hàm trong định nghĩa của sáng chế được đề xuất trong bản mô tả. Do đó, các ví dụ sau nhằm minh họa nhưng không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic

Ví dụ này mô tả các quá trình sinh hóa tiêu biểu để sản sinh 4-HB.

Các báo cáo trước đó về quá trình tổng hợp 4-HB ở vi sinh vật tập trung vào hợp chất này làm hợp chất trung gian trong quá trình sản sinh chất dẻo poly-hydroxyalkanoat (poly-hydroxyalkanoat-PHA) có khả năng phân hủy sinh học (patent Mỹ số 6,117,658). Việc sử dụng các copolyme của 4-HB/3-HB thay cho poly-3-hydroxybutyrat polyme (PHB) có thể tạo chất dẻo ít giòn hơn (Saito and Doi, *Intl. J. Biol. Macromol.* 16:99-104 (1994)). Quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic monome được mô tả trong sáng chế về cơ bản là quá trình khác biệt vì một số lý do: (1) sản phẩm được tiết ra, ngược với poly-hydroxyalkanoat được sinh tổng hợp bên trong tế bào và giữ lại ở trong tế bào; (2) đối với các vi sinh vật sản sinh các polyme hydroxybutanoat, axit 4-hydroxybutanoic tự do không được sinh tổng hợp, mà là dẫn xuất Coenzym A được sử dụng bởi polyhydroxyalkanoat syntaza; (3) trong trường hợp của polyme này, sự hình thành của các sản phẩm dạng hạt làm thay đổi quá trình nhiệt lực học; và (4) độ pH bên ngoài tế bào không phải là điều kiện để sinh tổng hợp polymer này, trong khi đó độ pH này sẽ tác động đến việc axit 4-hydroxybutanoic có mặt ở trạng thái axit tự do hoặc bazơ liên hợp và tồn tại cân bằng giữa axit 4-hydroxybutanoic và gama-butyrylacton. Axit 4-hydroxybutanoic có thể được tạo ra trong hai giai đoạn khử enzym từ suxinat, chất chuyển hóa chủ yếu của chu trình TCA, với

suxinic semialdehyt là hợp chất trung gian (Fig.1). Enzym thứ nhất trong số các enzym này là, suxinic semialdehyt dehydrogenaza, có nguồn gốc từ nhiều vi sinh vật bao gồm E. coli, trong đó các enzym phụ thuộc NADH và phụ thuộc NADPH đều được tìm thấy (Donnelly and Cooper, *Eur. J. Biochem.* 113:555-561 (1981); Donnelly and Cooper, *J. Bacteriol.* 145:1425-1427 (1981); Marek and Henson, *J. Bacteriol.*170:991-994 (1988)). Ngoài ra có bằng chứng hỗ trợ hoạt tính của suxinic semialdehyt dehydrogenaza ở *S. cerevisiae* (Ramos et al., *Eur. J. Biochem.* 149:401-404 (1985)) và và gen giả định đã được xác định bằng trình tự tương đồng. Tuy nhiên, hầu hết các báo cáo cho thấy rằng enzym này được tạo ra theo hướng tổng hợp suxinat, như được thể hiện trên Fig.1 (Donnelly and Cooper, *supra*; Lutke-Eversloh and Steinbuchel, *FEMS Microbiol. Lett.* 181:63-71 (1999)), tham gia vào quá trình phân hủy axit 4-hydroxybutanoic và gama-aminobutyrat. Suxinic semialdehyt cũng được sinh tổng hợp một cách tự nhiên bởi một số vi sinh vật như *E. coli* thông qua hợp chất trung gian của chu trình TCA là alpha-ketogluterat và tác dụng của hai enzym: glutamat:suxinic semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza. Quá trình thay thế, được sử dụng bởi vi khuẩn kỵ khí bắt buộc *Clostridium kluyveri* để phân hủy suxinat, hoạt hóa suxinat thành suxinyl-CoA, sau đó biến đổi suxinyl-CoA thành suxinic semialdehyt bằng cách sử dụng suxinic semialdehyt dehydrogenaza thay thế mà đã được biết đến để thực hiện chức năng theo hướng này (Sohling and Gottschalk, *Eur. J. Biochem.* 212:121-127 (1993)). Tuy nhiên, quá này đòi hỏi tiêu tốn năng lượng ATP để biến đổi suxinat thành suxinyl-CoA.

Enzym thứ hai tham gia vào quá trình này, 4-hydroxybutanoat dehydrogenaza, không có nguồn gốc từ *E. coli* hoặc nấm men nhưng được tìm thấy ở các vi khuẩn khác nhau như *C. kluyveri* và *Ralstonia eutropha* (Lutke-Eversloh and Steinbuchel, *supra*; Sohling and Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996); Valentin et al., *Eur. J. Biochem.* 227:43-60 (1995); Wolff and Kenealy, *Protein Expr. Purif.* 6:206-212 (1995)). Các enzym này cũng được biết đến là enzym phụ thuộc NADH, thông qua phụ thuộc NADPH cũng tồn tại. Quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic bổ sung từ alpha-ketoglutarat được chứng minh ở *E. coli* dẫn đến sự tích tụ poly(4-hydroxybutyric axit) (Song et al., *Wei Sheng Wu Xue.Bao.* 45:382-386 (2005)). Chủng tái tổ hợp đòi hỏi quá trình biểu hiện quá mức của ba gen không tương đồng mã hóa, poly-hydroxyalkanoat syntaza (*R. eutropha*), 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza (*R. eutropha*) và 4-

hydroxybutyrat:CoA transferaza (*C. kluyveri*), cùng với hai gen có nguồn gốc từ *E.coli*: glutamat:suxinic semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza. Các giai đoạn 4 và 5 trên Fig.1 có thể được thực hiện bởi alpha-ketoglutarat decarboxylaza như một enzym được xác định ở *Euglena gracilis* (Shigeoka et al., *Biochem. J.* 282(Pt2):319-323 (1992); Shigeoka and Nakano, *Arch. Biochem. Biophys.* 288:22-28 (1991); Shigeoka and Nakano, *Biochem J.* 292(Pt 2):463-467 (1993)). Tuy nhiên, enzym này trước đó chưa từng được sử dụng để tạo ra quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic hoặc các polyme liên quan ở vi sinh vật bất kỳ.

Khả năng sinh tổng hợp 4-hydroxybutyrat của vi sinh vật được nghiên cứu ở hai vi khuẩn, *Escherichia coli* và *Saccharomyces cerevisiae*, bằng cách sử dụng các mô hình chuyển hóa *in silico* của từng vi sinh vật. Các quá trình tiềm năng để sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic được tạo ra thông qua suxinat, suxinyl-CoA hoặc hợp chất trung gian glutamat alpha-ketoglutarat như được thể hiện trên Fig.1.

Giai đoạn thứ nhất trong quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic từ suxinat bao gồm quá trình biến đổi suxinat thành suxinic semialdehyt thông qua suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc NADH hoặc phụ thuộc NADPH. Ở *E. coli*, *gabD* là suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc NADP và là một phần của nhóm gen tham gia vào quá trình phân hủy và hấp thu 4-aminobutyrat (Niegemann et al.,. *Arch. Microbiol.* 160:454-460 (1993); Schneider et al., *J. Bacteriol.* 184:6976-6986 (2002)). Gen *sad* được tin là mã hóa cho enzym biểu hiện hoạt tính suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc NAD (Marek and Henson, *supra*). Chủng *S. cerevisiae* chỉ chứa suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc NADPH, được giả định là UGA2, mà khu trú vào bào tương (Huh et al., *Nature* 425:686-691 (2003)). Tính toán hiệu suất tối đa đưa ra giả định về quá trình biến đổi sucxinat thành axit 4-hydroxybutanoic ở cả *E. coli* và *S. cerevisiae* cần thiết để chỉ giả định rằng axit 4-hydroxybutanoic dehydrogenaza không có nguồn gốc tự nhiên đã được bổ sung vào hệ thống chuyển hóa của các chủng vi sinh vật này.

Quá trình biến đổi từ suxinyl-CoA thành 4-hydroxybutyrat được mô tả trong patent Mỹ số 6,117,658 là một phần của quá trình tổng hợp polyhydroxyalkanoat bao gồm các đơn vị 4-hydroxybutyrat monome. *Clostridium kluyveri* là một ví dụ về vi sinh vật đã được biết đến có hoạt tính suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA (Sohling

and Gottschalk, *supra*; Sohling and Gottschalk, *supra*). theo nghiên cứu này, được giả định là enzym này từ *C. kluyveri* hoặc vi sinh vật khác, được biểu hiện ở *E. coli* hoặc *S. cerevisiae* cùng với axit 4-hydroxybutanoic dehydrogenaza không tương đồng hoặc không có nguồn gốc tự nhiên để hoàn thành quá trình biến đổi từ suxinyl-CoA thành axit 4-hydroxybutanoic. Quá trình biến đổi từ alpha-ketoglutarat thành axit 4-hydroxybutanoic đã được chứng minh ở *E. coli* dẫn đến sự tích tụ poly(4-hydroxybutyric axit) lên đến 30% khối lượng tế bào khô (Song et al., *supra*) khi *E. coli* và *S. cerevisiae* có cả glutamat:suxinic semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza tự nhiên hoặc ngoại sinh (Coleman et al., *J. Biol. Chem.* 276:244-2,50 (2001)), quá trình biến đổi từ alpha-ketoglutarat thành axit 4-hydroxybutanoic có thể được thực hiện ở cả hai vi sinh vật này bằng cách giả định rằng chỉ axit 4-hydroxybutanoic dehydrogenaza có nguồn gốc không tự nhiên được tạo ra.

Ví dụ 2

Quá trình sinh tổng hợp 1,4-butandiol từ suxinat và alpha-ketoglutarat

Ví dụ này minh họa quá trình tạo ra và sinh tổng hợp 4-HB và BDO từ các vi sinh vật. Các quá trình sản sinh 4-HB và BDO được bộc lộ trong sáng chế.

Một số enzym thay thế có thể được sử dụng trong quá trình sản sinh được mô tả nêu trên. Enzym có nguồn gốc tự nhiên hoặc ngoại sinh để biến đổi suxinat thành suxinyl-CoA (giai đoạn 1 trên Fig.1) có thể được thay thế bằng CoA transferaza mag được mã hóa bởi gen *cat1* của *C. kluyveri* (Sohling and Gottschalk, *Eur.J Biochem.* 212:121-127 (1993)), có chức năng theo cách thức tương tự với giai đoạn 9. Tuy nhiên, quá trình sản sinh axetat bởi enzym này có thể không tối ưu, do axetat có thể được tiết ra hơn là được biến đổi ngược trở lại back thành axetyl-CoA. Theo khía cạnh này, cũng có thể có lợi để loại bỏ quá trình hình thành axetat ở giai đoạn 9. Để thay thế cho CoA transferaza này, cơ chế có thể được sử dụng trong đó axit 4-hydroxybutanoic trước hết được phosphoryl hóa bởi ATP và sau đó được biến đổi thành dẫn xuất CoA, tương tự với quá trình axetat kinaza/phosphotransaxetylaza ở *E. coli* để biến đổi axetat thành axetyl-CoA. Năng lượng cần thiết cho quá trình này là một ATP, tương ứng với năng lượng cần thiết để tái tạo axetyl-CoA từ axetat. Các enzym phosphotransbutyrylaza (ptb) và butyrat kinaza (bk) được biết đến là để thực hiện các giai đoạn này trên các phân tử không được hydroxyl hóa

trong quá trình sản sinh butyrat ở *C. acetobutylicum* (Cary et al., *Appl Environ Microbiol* 56:1576-1,583 (1990); Valentine, R. C. and R. S. Wolfe, *J Biol Chem.* 235:1948-1952 (1960)). Các enzym này là enzym thuận nghịch, cho phép tổng hợp theo hướng tạo thành axit 4-hydroxybutanoic.

Hợp chất 1,4-butandiol cũng có thể được sinh tổng hợp thông qua alpha-ketoglutarat bổ sung hoặc thay vì thông qua. Một quá trình được mô tả trước đó và tiếp tục minh họa dưới đây để thực hiện quá trình sinh tổng hợp sản phẩm cùng với quá trình sản sinh suxinic semialdehyt thông qua alpha–ketoglutarat bằng cách sử dụng các enzym ngoại sinh (Fig.1, các giai đoạn 4-5). Quá trình thay thế khác là sử dụng alpha–ketoglutarat decarboxylaza có thể thực hiện quá trình biến đổi này trong một giai đoạn (Fig.1, giai đoạn 8; Tian et al., *Proc Natl Acad Sci U S.A* 102:10670-10675 (2005)).

Để tạo ra các chủng vi sinh vật khác nhau của vi sinh vật sản sinh 1,4-butandiol, danh sách các gen có khả năng ứng dụng được tạo ra để làm chứng. Nói tóm lại, một hoặc nhiều gen tham gia vào các quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic và/hoặc 1,4-butandiol được xác định cho từng giai đoạn của toàn bộ quá trình sản sinh BDO được thể hiện trên Fig.1, sử dụng các nguồn tài liệu chuyên ngành sẵn có, cơ sở dữ liệu gen NCBI và các cơ sở dữ liệu truy cập tương tự. Các gen được tách dòng và đánh giá theo nghiên cứu này được thể hiện trong bảng 6 dưới đây, cùng với các trích dẫn URL và tài liệu tham khảo cho các trình tự. Như được bộc lộ thêm dưới đây, một số gen được tổng hợp để tối ưu hóa bộ ba mã hóa trong khi đó các gen còn lại được tách dòng thông quá phương pháp PCR từ ADN bộ gen của vi sinh vật có trong tự nhiên hoặc hoang dại. Đối với một số gen cả hai phương pháp tiếp cận này được sử dụng và trong trường hợp này các gen có nguồn gốc tự nhiên được chỉ ra bằng ký tự "n" với mã số phân loại gen khi được sử dụng trong thử nghiệm. Lưu ý rằng chỉ có các trình tự ADN khác nhau; còn các protein là giống nhau.

Bảng 6. Các gen được biểu hiện ở các vi sinh vật chủ sinh tổng hợp 1,4-butandiol.

Mã phân loại gen số	Phản ứng số (Fig.1)	Danh pháp gen	Nguồn vi sinh vật	Danh pháp enzym	Đường dẫn thể hiện trình tự protein	Tham chiếu

0001	9	Cat2	*Clostridium kluyveri* DSM 555	4-hydroxybutyrat coenzym A transferaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0002	12/13	adhE	*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824	Aldehyt/ rượu dehydrogenaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=1,5004739	2
0003	12/13	adhE2	*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824	Aldehyt/ rượu dehydrogenaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_14932,5.1	2
0004	1	Cat1	*Clostridium kluyveri* DSM 555	Suxinat coenzym A transferaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0008	6	sucD	*Clostridium kluyveri* DSM 555	Suxinic semialdehyt dehydrogenaza (phụ thuộc CoA)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0009	7	axit 4-hydroxybutanoicd	*Ralstonia eutropha* H16	4-hydroxybutyrat dehydrogenaza (phụ thuộc NAD)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=YP_726053.1	2
0010	7	axit 4-hydroxybutanoicd	*Clostridium kluyveri* DSM 555	4-hydroxybutyrat dehydrogenaza (phụ thuộc NAD)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0011	12/13	adhE	*E. coli*	Aldehyt/ rượu dehydrogenaza	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/gens.List.DetailAction.do?fromListFlag=true&featureType=1&orfId=1219	
0012	12/13	yqhD	*E. coli*	Aldehyt/ rượu dehydrogenaza	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/gens.List.DetailAction.do	
0013	13	bdhB	*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824	Butanol dehydrogenaza II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_349891.1	2
0020	11	ptb	*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824	Phospho-transbutyrylaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=1,5896327	2
0021	10	buk1	*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824	Butyrat kinaza I	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=20137334	2
0022	10	buk2	*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824	Butyrat kinaza II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=20137415	2
0023	13	adhEm	Phân lập được từ quần thể vi sinh vật kỵ khí phân hủy nước thải	Rượu dehydrogenaza		(37)d}
0024	13	adhE	*Clostridium thermocellum*	Rượu dehydrogenaza	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cth:Cthe_0423	
0025	13	ald	*Clostridium beijerinckii*	Coenzym A-axyl hóa aldehyt dehydrogenaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=49036681	(31)d}
0026	13	bdhA	*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824	Butanol dehydrogenaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_349892.1	2

Mã phân loại gen số	Phản ứng số (Fig.1)	Danh pháp gen	Nguồn vi sinh vật	Danh pháp enzym	Đường dẫn thể hiện trình tự protein	Tham chiếu
0027	12	bld	*Clostridium saccharoperbutyl acetonicum*	Butyraldehyt dehydrogenaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=31075383	4
0028	13	bdh	*Clostridium saccharoperbutyl acetonicum*	Butanol dehydrogenaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=124221917	4
0029	12/13	adhE	*Clostridium tetani*	Aldehyt/ rượu dehydrogenaza	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ctc:CTC01366	
0030	12/13	adhE	*Clostridium perfringens*	Aldehyt/ rượu dehydrogenaza	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpe:CPE2,531	
0031	12/13	adhE	*Clostridium difficile*	Aldehyt/ rượu dehydrogenaza	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cdf:CD2966	
0032	8	sucA	*Mycobacterium bovis* BCG, Pasteur	Alpha-ketoglutarat decarboxylaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=YP_977400,1	,5
0033	9	cat2	*Clostridium aminobutyricum*	4-hydroxybutyrat coenzym A transferaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=6249316	
0034	9	cat2	*Porphyromonas gingivalis* W83	4-hydroxybutyrat coenzym A transferaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=34,5415,58	
0035	6	sucD	*Porphyromonas gingivalis* W83	Suxinic semialdehyt dehydrogenaza (phụ thuộc CoA)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_904963.1	
0036	7	axit 4-hydroxybutanoicd	*Porphyromonas gingivalis* W83	NAD-dependent 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_904964.1	
0037	7	gbd	Uncultured bacterium	4-hydroxybutyrat dehydrogenaza	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=,5916168	6
0038	1	sucCD	*E. coli*	Suxinyl-CoA syntetaza	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/gens.List.DetailAction.do	

[1]Sohling and Gottschalk, *Eur. J. Biochem.* 212:121-127 (1993); Sohling and Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996)

[2]Nolling et al., J., *J. Bacteriol.* 183:4823-4838 (2001)

[3]Pohlmann et al., *Nat. Biotechnol.* 24:12,57-1262 (2006)

[4]Kosaka et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:58-68 (2007)

[5]Brosch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:5,596-5601 (2007)

[6]Henne et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3901-3907 (1999)

Tạo vectơ biểu hiện cho quá trình sản sinh BDO.

Các khung vectơ và một số chủng vi sinh vật thu được từ Dr. Rolf Lutz of Expressys (www.expressys.de/). Các vectơ và chủng vi sinh vật này được dựa trên hệ biểu hiện pZ được phát triển bởi Dr. Rolf Lutz và Prof. Hermann Bujard (Lutz, R. and H. Bujard, *Nucleic Axits Res* 25:1203-1210 (1997)). Các vectơ thu được bao gồm pZE13luc, pZA33luc, pZS*13luc và pZE22luc và chứa gen luciferaza làm đoạn đệm. Để thay thế đoạn đệm luciferaza bằng đoạn lacZ-alpha được kết thúc bằng các vị trí enzym cắt hạn chế thích hợp, trước tiên đoạn đệm luciferaza được loại bỏ khỏi mỗi vectơ nhờ phân cắt bằng EcoRI và XbaI. Đoạn lacZ-alpha được khuếch đại PCR từ pUC19 với các mồi sau:

lacZalpha-RI

5'GACGAATTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCACTGGCC GTCGTTTTAC3'

lacZalpha 3'BB

5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3'.

Quá trình này đã tạo ra đoạn gen với đầu 5' có vị trí EcoRI, vị trí NheI, vị trí gắn kết ribosom,vị trí SalI và bộ ba mã hóa khởi động. Ở đầu 3' của đoạn gen này chứa bộ ba mã hóa kết thúc, các vị trí XbaI, HindIII và AvrII. Sản phẩm PCR được phân cắt bằng EcoRI và AvrII và cài vào các vectơ gốc được phân cắt bằng EcoRI và XbaI (XbaI và AvrII có các đầu tương thích và tạo ra vị trí không phân cắt). Do các vị trí enzym cắt hạn chế NheI và XbaI tạo ra các đầu tương thích mà có thể được nối với nhau (nhưng tạo ra vị trí không phân cắt NheI/XbaI mà không được phân cắt bởi một trong hai), các gen được tách dòng vào các vectơ có thể được "Tạo cầu liên kết sinh học" với nhau (http://openwetware.org/wiki/Synthetic_Biology:BioBricks). Nói tóm lại, phương pháp này cho phép nối một số lượng không giới hạn các gen vào vectơ này bằng cách sử dụng 2 vị trí cắt hạn chế tương tự nhau (miễn là các vị trí đó không xuất hiện bên trong các gen này), do các vị trí ở giữa các gen bị phá hủy sau mỗi quá trình cài thêm.

Tất cả các vectơ có ký hiệu pZ heo sau bởi các ký hiệu và chữ số chỉ ra nguồn gốc của quá trình tái bản, gen chỉ thị kháng kháng sinh và tổ hợp trình tự khởi đầu/điều hòa.

Nguồn gốc của quá trình tái bản là ký tự thứ hai và được ký hiệu là E đối với ColE1, A đối với p15A và S đối với pSC101 dựa trên các vectơ ban đầu. Chữ số thứ nhất biểu thị gen chỉ thị kháng kháng sinh (1 kháng Ampicillin, 2 kháng Kanamyxin, 3 kháng Chloramphenicol, 4 kháng Spectinomycin và 5 kháng Tetraxyclin). Chữ số cuối cùng chỉ ra rằng trình tự khởi đầu điều hòa gen quan tâm (1 đối với $P_{LtetO-1}$, 2 đối với $P_{LlacO-1}$, 3 đối với $P_{A1lacO-1}$ và 4 đối với $P_{lac/ara-1}$). MCS và gen quan tâm tiếp theo ngay sau đó. Đối với vấn đề được thảo luận ở đây, các tác giả sáng chế đã sử dụng hai vectơ gốc, pZA33 và pZE13, đã gây đột biến cho các đoạn chèn tạo cầu liên kết sinh học như được bộc lộ nêu trên. Một khi các gen quan tâm đã được tách dòng vào các plasmit này, các plasmit thu được được chỉ ra bằng cách sử dụng bốn số ký tự gen được thể hiện trong bảng 6; ví dụ, pZA33-XXXX-YYYY-...

Chủng vi sinh vật chủ

Chủng gốc trong tất cả các nghiên cứu được mô tả trong sáng chế là *E. coli* K-12 chủng MG1655. Các chủng loại bỏ ít gen chỉ thị ở adhE, gabD and Alda được tạo ra theo hợp đồng dịch vụ do bên thứ ba bằng cách sử dụng phương pháp redET (Datsenko, K. A. and B. L. Wanner, *Proc Natl Acad Sci U S.A* 97:6640-664,5 (2000)). Sau đó, các chủng này được tạo ra thông qua quá trình tải nạp thông qua thực khuẩn thể P1 (Miller, J. Experiments inmolecular Gentics, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1973)). Chủng C600Z1 ($laci^q$, PN25-tetR, Sp^R, lacY1, leuB6,mcrB+, supE44, thi-1, thr-1, tonA21) thu được từ Expressys và được sử dụng làm nguồn alen $lacI^q$ cho quá trình tải nạp P1. Thực khuẩn thể P1vir được sinh trưởng trên chủng *E. coli* C600Z1, có gen kháng spectinomyxin được liên kết với $lacI^q$. Dịch phân giải P1 sinh trưởng trên C600Z1 được sử dụng để lây nhiễm MG1655 với lựa chọn để kháng spectinomyxin. Sau đó, các khuẩn lạc kháng spectinomyxin được sàng lọc đối với $lacI^q$ đã được liên kết bằng cách xác định khả năng của các chủng tải nạp để ứng chế quá trình biểu hiện gen đã được liên kết với trình tự khởi đầu. Chủng thu được được ký hiệu là MG1655 $lacI^q$. Quy trình tương tự được sử dụng để chèn $lacI^Q$ vào quá trình loại bỏ các chủng này.

Quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic từ suxinat

Để tạo ra vi sinh vật sản sinh axit 4-hydroxybutanoic từ suxinat, các gen mã hóa các giai đoạn biến đổi từ suxinat thành axit 4-hydroxybutanoic và 4-hydroxybutyryl-CoA

(1, 6, 7 và 9 trên Fig.1) được liên hợp vào các vectơ pZA33 và pZE13 như được mô tả dưới đây. Các tổ hợp gen khác nhau đã được đánh giá, cũng như các cấu trúc chứa các quá trình không đầy đủ làm đối chứng (Các Bảng 7 và 8). Sau đó các plasmit được biến nạp vào các chủng vi sinh vật chủ chứa $lacI^Q$, cho phép biểu hiện cảm ứng bằng cách bổ sung thêm isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG). Cả chủng vi sinh vật chủ và hoang dại được loại bỏ các gen mã hóa suxinic semialdehyt dehydrogenaza có nguồn gốc tự nhiên (giai đoạn 2 trên Fig.1) đã được thử nghiệm.

Trước hết, hoạt tính của các enzym không tương đồng được đánh giá thông qua các thử nghiệm *in vitro*, sửu dụng chủng MG1655 $lacI^Q$ làm vi sinh vật chủ cho các cấu trúc plasmit chứa các gen quá trình. Các tế bào được sinh trưởng hiếu khí trên môi trường LB (Difco) chứa các kháng sinh thích hợp cho mỗi cấu trúc và được cảm ứng bằng cách bổ sung thêm 1mM β-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) khi mật độ quang ở bước sóng 600nM (OD600) đạt được xấp xỉ 0,5. Sau 6 giờ thu lấy các tế bào và thử nghiệm enzym được thực hiện như được bộc lộ dưới đây.

Thử nghiệm enzym *in vitro*

Để thu được các dịch chiết thô sử dụng trong các thử nghiệm hoạt tính, thu lấy các tế bào bằng cách ly tâm ở tốc độ 4500 vòng/phút (Beckman-Coulter, Allegera X-1,5R) trong 10 phút. Các hạt tế bào được tạo hỗn dịch trong 0,3mL thuốc thử BugBuster (Novagen) chứa benzonaza và lysozym và quá trình phân giải được thực hiện trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc nhẹ. Thu lấy dịch phân giải không chứa tế bào bằng cách ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút (Eppendorf centrifuge 5402) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Protein tế bào trong mẫu thử được xác định bằng cách sử dụng phương pháp của Bradford et al., *Anal. Biochem.* 72:2481-254 (1976) và specific enzym assays conducted như được mô tả dưới đây. Hoạt tính được tính theo đơn vị U/mg protein, trong đó đơn vị hoạt tính được định nghĩa là lượng enzym cần thiết để biến đổi 1μmol cơ chất trong thời gian 1 phút. ở nhiệt độ trong phòng. Nói chung, giá trị được ghi nhận là giá trị trung bình của 3 thử nghiệm lặp lại.

Hoạt tính suxinyl-CoA transferaza (Cat1) được xác định bằng cách kiểm soát quá trình hình thành của axetyl-CoA từ suxinyl-CoA và axetat, được biến đổi từ quy trình đã được mô tả trước đó, Sohling and Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996). Hoạt tính

suxinyl-CoA syntetaza (SucCD) được xác định được xác định bằng cách kiểm soát quá trình hình thành của suxinyl-CoA từ suxinat và CoA trong sự có mặt của ATP. Thử nghiệm này được biến đổi từ quy trình được mô tả bởi Cha and Parks, *J. Biol. Chem.* 239:1961-1967 (1964). Hoạt tính suxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA (SucD) được xác định bằng cách kiểm soát quá trình biến đổi NAD thành NADH ở bước sóng 340nm với sự có mặt của suxinat semialdehyt và CoA (Sohling and Gottschalk, *Eur. J. Biochem.* 212:121-127 (1993)). Hoạt tính enzym axit 4-hydroxybutanoic dehydrogenaza (axit 4-hydroxybutanoicd) được xác định bằng cách kiểm soát quá trình oxi hóa NADH thành NAD ở bước sóng 340nm với sự có mặt của suxinat semialdehyt. Thử nghiệm này được biến đổi từ quy trình đã được công bố Gerhardt et al. *Arch. Microbiol.* 174:189-199 (2000). Hoạt tính axit 4-hydroxybutanoic CoA transferaza (Cat2) được xác định bằng cách sử dụng quy trình được biến đổi từ Scherf and Buckel, *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2699-2702 (1991). Quá trình hình thành của 4-hydroxybutyryl-CoA hoặc butyryl-CoA từ axetyl-CoA và axit 4-hydroxybutanoic hoặc butyrat được xác định bằng cách sử dụng phương pháp HPLC.

Rượu (ADH) và aldehyt (ALD) dehydrogenaza được đánh giá theo hướng giản lược bằng cách sử dụng quy trình được phỏng theo từ một số nguồn tài liệu chuyên ngành (Durre et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 17:251-262 (1995); PalosaarI và Rogers, *J. Bacteriol.* 170:2971-2976 (1988) và Welch et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 273:309-318 (1989). Quá trình oxi hóa NADH được kiểm soát bằng cách đọc độ hấp thụ ở bước sóng 340nm cách bốn giây trong thời gian tổng số 240 giây ở nhiệt độ trong phòng. Các thử nghiệm giản lược này được thực hiện trong 100mM MOPS (được điều chỉnh đến pH 7,5 bằng KOH), 0,4mM NADH và từ 1 đến 50µL dịch chiết tế bào. Phản ứng được hoạt hóa bằng cách bổ sung các thuốc thử sau: 100µL axetaldehyt 100mM hoặc butyraldehyt 100mM đối với ADH, hoặc 100µL axetyl-CoA 1mM hoặc butyryl-CoA 1mM đối với ALD. Thiết bị quang phổ được hiệu chỉnh nhanh mẫu trắng và sau đó quá trình theo dõi động học phản ứng được bắt đầu. Độ dốc của đường đồ thị giảm độ hấp thụ ở bước sóng 340nm trên phút, cùng với hệ số tắt mol của NAD(P)H ở bước sóng 340nm (6000) và nồng độ protein của dịch chiết, có thể được sử dụng để xác định hoạt tính đặc hiệu.

Hoạt tính enzym của PTB được xác định theo hướng biến đổi từ butyryl-CoA thành butyryl-phosphat như được mô tả trong Cary et al. *J. Bacteriol.* 170:4613-4618 (1988). Sáng chế đề xuất phosphat vô cơ để biến đổi và do đó làm tăng CoA tự do với thuốc thử 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic axit), hoặc DTNB. DTNB phản ứng nhanh với các nhóm thiol như coA tự do để giải phóng axit 2-nitro-5-mercaptobenzoic màu vàng (TNB), hấp thụ ở bước sóng 412 nm với hệ số tắt mol là 14140 M cm^{-1}. Dung dịch đệm thử nghiệm chứa 150mM kali phosphat ở pH 7,4, 0,1mM DTNB và 0,2mM butyryl-CoA và phản ứng được hoạt hóa bằng cách bổ sung từ 2 đến 50µL dịch chiết tế bào. Hoạt tính enzym của BK được xác định theo hướng biến đổi từ butyrat thành butyryl-phosphat tiêu tốn năng lượng ATP. Quy trình này là tương tự như thử nghiệm đối với axetat kinaza đã được mô tả trước đó Rose et al., *J. Biol. Chem.* 211:737-7,56 (19,54). Tuy nhiên, các tác giả sáng chế đã tìm ra một quy trình thử nghiệm enzym axetat kinaza khác được đề xuất bởi Sigma hữu ích và có độ nhạy cao hơn. Thử nghiệm này liên hợp quá trình biến đổi ATP thành ADP bởi axetat kinaza với quá trình biến đổi được liên hợp ADP và phosphoenol pyruvat (PEP) thành ATP và pyruvat bởi pyruvat kinaza, tiếp theo bởi quá trình biến đổi pyruvat và NADH thành lactat và NAD+ bởi lactat dehydrogenaza. Thay thế butyrat cho axetat là quá trình biến đổi quan trọng để cho phép thử nghiệm theo hoạt tính enzym BK. Hỗn hợp thử nghiệm chứa 80mM đệm trietanolamin ở pH 7,6, 200mM natri butyrat, 10mM $MgCl_2$, 0,1mM NADH, 6,6mM ATP, 1,8mM phosphoenolpyruvat. Pyruvat kinaza, lactat dehydrogenaza và myokinaza được bổ sung theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. The phản ứng được hoạt hóa bằng cách bổ sung từ 2 đến 50µL dịch chiết tế bào và phản ứng này được kiểm soát dựa trên sự giảm độ hấp thụ ở bước sóng 340nm thể hiện quá trình oxi hóa NADH.

Phân tích các dẫn xuất CoA bằng phương pháp HPLC

Thử nghiệm trên cơ sở HPLC được phát triển để kiểm soát các phản ứng enzym bao gồm phản ứng chuyển coenzym A (CoA). Phương pháp được phát triển này cho phép mô tả đặc điểm hoạt tính enzym bằng cách định lượng CoA, axetyl CoA (AcCoA), butyryl CoA (BuCoA) và 4-hydroxybutyrat CoA (4-hydroxybutyryl-CoA) có trong các hỗn hợp phản ứng *in vitro*. Đạt được độ nhạy dưới ngưỡng µM thấp, cũng như độ phân giải tuyệt vời của tất cả các dẫn xuất CoAs quan tâm.

Quy trình chuẩn bị mẫu thử và hóa chất được thực hiện như sau. Nói tóm lại, CoA, AcCoA, BuCoA và tất cả các hóa chất khác, có được từ Sigma-Aldrich. Các dung môi, metanol và axetonitril, là theo phân loại phương pháp. Đường chuẩn thể hiện độ tuyến tính tuyệt vời trong khoảng nồng độ từ 0,01 đến 1mg/mL. Các hỗn hợp phản ứng enzym chứa 100mM đệm Tris HCl (pH 7), từng phần hỗn hợp được sử dụng tại các thời điểm khác nhau, được dừng phản ứng bằng axit formic (nồng độ cuối cùng 0,04%) và được phân tích trực tiếp bằng HPLC.

Phân tích HPLC được thực hiện sử dụng hệ thống HPLC Agilent 1100 HPLC được trang bị bơm hai cấu tử, bộ phận đuổi khí, bộ phận lấy mẫu tự động và ngăn cột được ổn định nhiệt độ và bộ dò mảng điot (DAD), được sử dụng để phân tích. Cột pha đảo, Kromasil 100 5µm C18, 4,6x150mm (Peeke Scientific), đã được sử dụng. 25mM kali phosphat (pH 7) và metanol hoặc axetonitril, được sử dụng làm các dung môi hữu cơ hoặc dung dịch nước ở tốc độ dòng 1mL/phút. Hai phương pháp đã được phát triển: một phương pháp có thời gian phân tích ngắn với gradient nhanh hơn để phân tích CoA, AcCoA và BuCoA được phân giải và phương pháp dài hơn để phân biệt giữa quá trình rửa giải AcCoA và axit 4-hydroxybutanoicCoA. Phương pháp có thời gian phân tích ngắn đã sử dụng gradient axetonitril (0phút - 5%, 6phút - 30%, 6,5phút - 5%, 10phút - 5%) và thu được thời gian lưu tương ứng là 2,7, 4,1 và 5,5phút đối với CoA, AcCoA và BuCoA. Theo phương pháp có thời gian phân tích dài hơn methanol được sử dụng với gradient tuyến tính như sau: 0phút - 5%, 20 phút - 35%, 20,5phút - 5%, 2,5phút - 5%. Thời gian lưu đối với CoA, AcCoA, axit 4-hydroxybutanoicCoA và BuCoA tương ứng là 5,8, 8,4, 9,2 và 16,0 phút. Thể tích tiêm mẫu là 5µL, nhiệt độ cột 30°C độ hấp thụ tử ngoại khả kiến được kiểm soát ở bước sóng 260nm.

Các kết quả đã chứng minh hoạt tính của từng giai đoạn trong số bốn giai đoạn quá trình này (bảng 7), mặc dù hoạt tính phụ thuộc chặt chẽ vào nguồn gen, nhưng vị trí của gen trên vectơ và vị trí của các gen khác cùng với gen này được biểu hiện. Ví dụ, gen 0035 mã hóa suxinic semialdehyt dehydrogenaza có hoạt tính lớn hơn so với suxinic semialdehyt dehydrogenaza được mã hóa bởi gen 0008 và 0036 và 0010n là các gen mã hóa axit 4-hydroxybutanoic dehydrogenaza có hoạt tính lớn hơn gen 0009. Dường như hoạt tính axit 4-hydroxybutanoic dehydrogenaza sẽ cao hơn khi có một gen khác có trước gen mã hóa cho nó trên operon tương tự.

Bảng 7. Hoạt tính *in vitro* của enzyme có trong dịch chiết tế bào thu được từ MG1655 lacI^Q chứa các plasmit biểu hiện gen tham gia vào quá trình sản sinh 4-HB-CoA. Hoạt tính được theo đơn vị U/mg protein, trong đó, một đơn vị hoạt tính được định nghĩa là lượng enzym cần thiết để biến đổi 1µmol cơ chất trong thời gian 1 phút, ở nhiệt độ trong phòng.

Mẫu	pZE13 (a)	pZA33 (b)	OD600	Protein tế bào (nồng độ)	Cat1	SucD	4HBd	Cat2
1	cat1 (0004)		2,71	6,43	1,232	0,00		
2	cat1 (0004)-sucD (0035)		2,03	5,00	0,761	2,57		
3	cat1 (0004)-sucD (0008)		1,04	3,01	0,783	0,01		
4	sucD (0035)		2,31	6,94		2,32		
5	sucD (0008)		1,10	4,16		0,05		
6		4hbd (0009)	2,81	7,94	0,003		0,25	
7		4hbd (0036)	2,63	7,84			3,31	
8		4hbd (0010n)	2,00	5,08			2,57	
9	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	2,07	5,04	0,600	1,85	0,01	
10	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	2,08	5,40	0,694	1,73	0,41	
11	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	2,44	4,73	0,679	2,28	0,37	
12	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	1,08	3,99	0,572	-0,01	0,02	
13	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0,77	2,60	0,898	-0,01	0,04	
14	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0,63	2,47	0,776	0,00	0,00	
15		cat2 (0034)	2,56	7,86				1,283
16		cat2 (0034)-4hbd (0036)	3,13	8,04			24,86	0,993
17		cat2 (0034)-4hbd (0010n)	2,38	7,03			7,45	0,675
18		4hbd (0036)-cat2 (0034)	2,69	8,26			2,15	7,490
19		4hbd (0010n)-cat2 (0034)	2,44	6,59			0,59	4,101

Các gen được biểu hiện từ Plac trên pZE13, plasmit bản sao cao với vectơ gốc là colE1 và gen kháng ampixilin. Mã phân loại gen được thể hiện trên Bảng 6

Các gen được biểu hiện từ Plac trên pZA33, plasmit bản sao trung bình với vectơ gốc là pACYC và gen kháng chloramphenicol.

(c) Protein tế bào được tính theo đơn vị mg protein trên mL dịch chiết.

Sau đó, các chủng tái tổ hợp chứa gen tham gia vào quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic được đánh giá về khả năng sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic *in vivo* từ các chất trung gian chuyển hóa chủ yếu. Các tế bào được sinh trưởng kỵ khí trên môi trường LB đến mật độ quang ở bước sóng 600nm (OD600) đạt xấp xỉ 0,4, sau đó được cảm ứng bằng 1mM IPTG. Một giờ sau đó, natri suxinat được bổ sung vào đến nồng độ 10mM và các mẫu được lấy để phân tích sau 24 giờ và 48 giờ bổ sung. Hợp chất axit 4-hydroxybutanoic trong canh trường nuôi cấy được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí (GC-MS) như được mô tả dưới đây. Các kết quả cho thấy rằng chủng tái tổ hợp có thể sinh tổng hợp hơn 2mM axit 4-hydroxybutanoic sau 24 giờ, so với hầu như bằng không ở chủng đối chứng (bảng 8).

Bảng 8. Quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic từ suxinat ở các chủng *E. coli* chứa các plasmit biểu hiện tổ hợp gen khác nhau tham gia vào quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic.

Mẫu	Chủng vi sinh vật chủ	pZE13	pZA33	24 giờ			48 giờ		
				OD600	4HB, µg	4HB chuẩn hóa (a)	OD600	4HB, µg	4HB chuẩn hóa (a)
1	MG1655 laclq	catl (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0,47	487	1036	1,04	1780	1711
2	MG1655 laclq	catl (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0,41	111	270	0,99	214	217
3	MG1655 laclq	catl (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0,47	863	1835	0,48	2152	4484
4	MG1655 laclq	catl (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0,46	956	2078	0,49	2221	4533
5	MG1655 laclq	catl (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0,38	493	1296	0,37	1338	3616
6	MG1655 laclq	catl (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0,32	26	81	0,27	87	323
7	MG1655 laclq	catl (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0,24	506	2108	0,31	1448	4872
8	MG1655 laclq	catl (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0,24	78	324	0,56	233	416
9	MG1655 laclq gab D	catl (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0,53	656	1237	1,03	1648	1595
10	MG1655 laclq gab D	catl (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0,44	92	209	0,98	214	218
11	MG1655 laclq gab D	catl (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0,51	1072	2102	0,97	2358	2431
12	MG1655 laclq gab D	catl (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0,51	981	1924	0,97	2121	2186
13	MG1655 laclq gab D	catl (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0,35	407	1162	0,77	1178	1530
14	MG1655 laclq gab D	catl (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0,51	19	36	1,07	50	47
15	MG1655 laclq gab D	catl (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0,35	594	1669	0,78	1350	1731
16	MG1655 laclq gab D	catl (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0,32	74	232	0,82	232	283
17	MG1655 laclq	chỉ vectơ	chỉ vectơ	0,8	1	2	1,44	3	2
18	MG1655 laclq gab D	chỉ vectơ	chỉ vectơ	0,89	1	2	1,41	7	5

(a) Nồng độ axit 4-hydroxybutanoic được chuẩn hóa, đơn vị µM/OD600

Quá trình thay thế sử dụng CoA transferaza (catl) để sinh tổng hợp suxinyl-CoA từ suxinat là sử dụng các gen *sucCD* ở *E. coli* có nguồn gốc tự nhiên, mã hóa suxinyl-CoA syntetaza. Cụm gen này được tách dòng vào pZE13 cùng với các gen tiềm năng đối với các giai đoạn còn lại theo hướng tạo ra axit 4-hydroxybutanoic để tạo thành pZE13-0038-0035-0036.

Quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic từ glucoza.

Mặc dù các thử nghiệm nêu trên chứng minh quá trình sản sinh chức năng axit 4-hydroxybutanoic từ chất trung gian chuyển hóa chủ yếu (suxinat), nhưng quy trình công nghiệp đòi hỏi quá trình tổng hợp các hóa chất này từ các nguyên liệu carbohydrat chi phí thấp như glucoza hoặc sucroza. Do đó, mục tiêu của các thử nghiệm tiếp theo là để xác định liệu suxinat ngoại sinh được sản sinh bởi các tế bào trong quá trình sinh trưởng trên glucoza có thể là nguyên liệu cho quá trình sản sinh axit 4-hydroxybutanoic hay không. Các tế bào được sinh trưởng kỵ khí trên môi trường tối thiểu M9 (6,78g/L Na_2HPO_4, 3,0g/L KH_2PO_4, 0,5g/L NaCl, 1,0g/L NH_4Cl, 1mM $MgSO_4$, 0,1mM $CaCl_2$) được bổ sung

với 20g/L glucoza, 100mM axit 3-(N-morpholino)propansulfonic (MOPS) để cải thiện dung lượng đệm, 10 μg/mL thiamin và các kháng sinh thích hợp. 0,25mM IPTG được bổ sung vào khi mật độ quang ở bước sóng 600nm (OD600) đạt được xấp xỉ 0,2 và các mẫu được lấy để phân tích axit 4-hydroxybutanoic mỗi 24 giờ sau cảm ứng. Trong tất cả các trường hợp axit 4-hydroxybutanoic được giữ nguyên sau 24 giờ, với nồng độ cực đại là khoảng 1nM ở các chủng tốt nhất (Fig.3a), trong khi đó nồng độ suxinat tiếp tục tăng (Fig.3b). Điều này chỉ ra rằng việc bổ sung suxinat vào quá trình này là dường như không có giới hạn và hiện tượng "thắt nút chai"có thể là do hoạt tính của bản thân các enzym hoặc độ khả dụng của NADH. 0035 and 0036 rõ ràng là các gen tiềm năng tốt nhất tương ứng cho suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA và axit 4-hydroxybutanoic dehydrogenaza. Quá trình loại bỏ một hoặc cả hai gen mã hóa đã biết (gabD) hoặc suxinic semialdehyt dehydrogenaza giả định có nguồn gốc tự nhiên (aldA) ảnh hưởng không đáng kể đến hiệu suất quá trình. Cuối cùng, lưu ý rằng các tế bào sinh trưởng đến mật độ quang thấp hơn nhiều ở các chủng sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic so với ở các chủng đối chứng (Fig.3c).

Quá trình thay thế để sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic từ glucoza là thông qua alpha-ketoglutarat. Các tác giả sáng chế đã bộc lộ việc sử dụng alpha-ketoglutarat decarboxylaza từ *Mycobacterium tuberculosis* Tian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:10670-10675 (2005) để sinh tổng hợp có định hướng suxinic semialdehyt từ alpha-ketoglutarat (giai đoạn 8 trên Fig.1). Để chứng minh rằng gen này (0032) là có chức năng *in vivo*, các tác giả sáng chế đã biểu hiện gen đó trên pZE13 ở vi sinh vật chủ tương tự như axit 4-hydroxybutanoic dehydrogenaza (gen 0036) trên pZA33. Chủng này có khả năng sinh tổng hợp trên 1,0mM axit 4-hydroxybutanoic trong vòng 24 giờ sau khi cảm ứng bằng 1mM IPTG (Fig.4). Do chủng này không biểu hiện suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA, nên có thể quá trình sản sinh suxinic semialdehyt thông qua suxinyl-CoA được loại bỏ. Cũng có thể các gen có nguồn gốc tự nhiên chịu trách nhiệm sinh tổng hợp suxinic semialdehyt có thể thực hiện chức năng ở quá trình này (các giai đoạn 4 và 5 trên Fig.1); tuy nhiên, lượng axit 4-hydroxybutanoic được sinh tổng hợp khi plasmit pZE13-0032 còn lại của vi sinh vật chủ là không đáng kể.

Quá trình sản sinh BDO từ axit 4-hydroxybutanoic

Quá trình sản sinh BDO từ axit 4-hydroxybutanoic cần hai giai đoạn khử, được xúc tác bởi các enzym dehydrogenaza. Rượu và aldehyt dehydrogenaza (tương ứng là ADH và ALD) là các enzym phụ thuộc NAD+/H và/hoặc NADP+/H mà cùng nhau có thể khử nhóm chức axit carboxylic trên một phân tử thành nhóm chức rượu, hoặc theo chiều ngược lại, có thể thực hiện quá trình oxi hóa rượu thành axit carboxylic. Quá trình biến đổi sinh học này đã được chứng minh ở chủng tự nhiên *Clostridium acetobutylicum* (Jewell et al., *Current Microbiology*, 13:215-19 (1986)), nhưng không có enzym chịu trách nhiệm cũng như không có gen chịu trách nhiệm quá trình này được xác định. Ngoài ra, vẫn chưa được biết đến liệu quá trình hoạt hóa thành 4-hydroxybutyryl-CoA được yêu cầu trước tiên hay không (giai đoạn 9 trên Fig.1), hoặc nếu aldehyt dehydrogenaza (giai đoạn 12) có thể tác động có định hướng lên axit 4-hydroxybutanoic. Các tác giả sáng chế đã phát triển một loạt các enzym tiềm năng từ *C. acetobutylicum* vi sinh vật liên quan dựa trên hoạt tính đã biết với các đồng đẳng không được hydroxyl hóa từ axit 4-hydroxybutanoic và các chất trung gian của quá trình này, hoặc dựa trên độ tương đồng với các gen đã được mô tả đặc tính này (bảng 6). Do một số enzym tiềm năng là các dehydrogenaza đa chức, các enzym này có khả năng xúc tác quá trình khử phụ thuộc NAD(P)H axit (hoặc dẫn xuất CoA) thành aldehyt và aldehyt thành rượu. Trước khi bắt đầu sử dụng với các gen này ở *E. coli*, trước hết các tác giả sáng chế đã thẩm định kết quả tham chiếu nêu trên bằng cách sử dụng *C. acetobutylicum* ATCC 824. Các tế bào được sinh trưởng trên canh trường Schaedler (Accumedia, Lansing, MI) được bổ sung với 10mM axit 4-hydroxybutanoic, trong điều kiện kỵ khí là 10% CO_2, 10% H_2 và 80% N_2 ở nhiệt độ 30°C. Các mẫu nuôi cấy định kỳ được lấy ra, ly tâm và canh trường được phân tích về 1,4-butandiol bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ như được mô tả dưới đây. Nồng độ 1,4-butandiol tương ứng là 0,1mM, 0,9mM và 1,.5mM được phát hiện sau 1 ngày, 2 ngày và 7 ngày ủ. Không có 1,4-butandiol đã được phát hiện ở canh trường nuôi cấy mà không bổ sung axit 4-hydroxybutanoic. Để chứng minh rằng 1,4-butandiol được sinh tông hợp là thu được từ glucoza, các tác giả sáng chế đã nuôi cấy chủng sinh tổng hợp 1,4-butandiol tốt nhất MG1655 $lacI^Q$ pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036 trên môi trường tối thiểu M9 được bổ sung với 4g/L glucoza được đánh dấu đồng vị ^{13}C đồng nhất. Các tế bào được cảm ứng ở mật độ quang là 0,67 bằng1mM IPTG và mẫu được lấy ra sau 24 giờ. Phân tích dịch nổi canh trường tế bào được thực hiện theo phương pháp khối phổ.

Tiếp theo, gen tiềm năng cho quá trình biến đổi axit 4-hydroxybutanoic thành 1,4-butandiol được thử nghiệm về hoạt tính khi được biểu hiện ở vi sinh vật chủ *E. coli* MG1655 lacI^{Q}. Các chủng tái tổ hợp chứa mỗi gen tiềm năng này được biểu hiện trên pZA33 được sinh trưởng với sự có mặt của 0,25mM IPTG trong bốn giờ ở nhiệt độ 37°C để tạo ra quá trình biểu hiện hoàn toàn enzym. Bốn giờ sau khi cảm ứng, thu lấy các tế bào và thử nghiệm hoạt tính ADH và ALD như được mô tả nêu trên. Do 4-hydroxybutyryl-CoA và 4-hydroxybutyraldehyt không sẵn có trên thị trường, các thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng các cơ chất không được hydroxyl hóa (bảng 9). Tỷ lệ về hoạt tính giữa các cơ chất 4-cacbon và 2-cacbon đối với *C. acetobutylicum adhE2* (0002) và *E. coli adhE* (0011) là tương tự với các kết quả được ghi nhận trước đó trong tài liệu chuyên ngành Atsumi et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1207:1-11 (1994).

Bảng 9. Hoạt tính enzym i*n vitro* trong các dịch chiết tế bào từ MG1655 lacI^{Q} chứa pZA33 biểu hiện gen thay thế cho các aldehyt và rượu dehydrogenaza. Hoạt tính được thể hiện theo μmol phút^{-1} mg tế bào protein^{-1}. N.D., không xác định.

		Aldehyt dehydrogenaza		Rượu dehydrogenaza	
Gen	Cơ chất	Butyryl-CoA	Axetyl-CoA	Butyraldehyt	Axetaldehyt
0002		0,0076	0,0046	0,0264	0,0247
0003n		0,0060	0,0072	0,0080	0,0075
0011		0,0069	0,0095	0,0265	0,0093
0013		N.D.	N.D.	0,0130	0,0142
0023		0,0089	0,0137	0,0178	0,0235
0025		0	0,0001	N.D.	N.D.
0026		0	0,0005	0,0024	0,0008

Đối với các thử nghiệm sinh tổng hợp 1,4-butandiol, gen *cat2* từ *Porphyromonas gingivalis* W83 (gen 0034) được tạo ra trên pZA33 để biến đổi axit 4-hydroxybutanoic thành 4-hydroxybutyryl-CoA, trong khi đó các gen dehydrogenaza tiềm năng đã được biểu hiện trên pZE13. Chủng vi sinh vật chủ là MG1655 lacI^{Q}. Cùng với rượu và aldehyt dehydrogenaza tiềm năng, các tác giả sáng chế cũng đã thử nghiệm khả năng của suxinic semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoAs (*sucD*) để thực hiện chức năng ở giai đoạn này, do độ tương đồng của các cơ chất. Các tế bào được sinh trưởng đến mật độ quang là khoảng 0,5 trên môi trường LB được bổ sung với 10mM axit 4-hydroxybutanoic, được cảm ứng bằng 1mM IPTG và các mẫu canh trường được lấy ra sau 24 giờ và phân tích đối

với 1,4-butandiol như được mô tả dưới đây. Quá trình sản sinh BDO tốt nhất xuất hiện bằng cách sử dụng gen *adhE2* từ *C. acetobutylicum*, *sucD* từ *C. kluyveri*, hoặc *sucD* từ *P. gingivalis* (Fig.5). Ngạc nhiên là, lượng 1,4-butandiol tuyệt đối được sinh tổng hợp là cao hơn dưới các điều kiện hiếu khí; tuy nhiên, điều này chủ yếu là do mật độ tế bào thấp hơn thu được ở các canh trường kỵ khí. Khi được chuẩn hóa với mật độ quang của tế bào, lượng 1,4-butandiol được sinh tổng hợp trên đơn vị sinh khối là cao hơn ở các điều kỵ khí (bảng 10).

Bảng 10. Nồng độ 1,4-butandiol tuyệt đối và được chuẩn hóa từ các môi trường nuôi cấy các tế bào biểu hiện gen *adhE2* từ *C. acetobutylicum*, gen *sucD* từ *C. kluyveri*, hoặc gen *sucD* từ *P. gingivalis* (dữ liệu từ các thử nghiệm 2, 9 và 10 trên Fig.3), cũng như mẫu đối chứng âm tính (Thử nghiệm 1).

Gen được biểu hiện	Điều kiện	1,4-butandiol (μM)	Mật độ quang (600nm)	1,4-butandiol/Mật độ quang
không	Hiếu khí	0	13,4	0
không	Vi hiếu khí	0,5	6,7	0,09
không	Kỵ khí	2,2	1,26	17,5
0002	Hiếu khí	138,3	9,12	15,2
0002	Vi hiếu khí	48,2	5,52	8,73
0002	Kỵ khí	54,7	1,35	40,5
0008n	Hiếu khí	25,58	5,37	47,6
0008n	Vi hiếu khí	127,9	3,05	41,9
0008n	Kỵ khí	60,8	0,62	98,1
0035	Hiếu khí	21,3	14,0	1,52
0035	Vi hiếu khí	13,1	4,14	3,16
0035	Kỵ khí	21,3	1,06	20,1

Như được bộc lộ nêu trên, có thể có lợi khi sử dụng quá trình này để biến đổi axit 4-hydroxybutanoic thành 4-hydroxybutyryl-CoA mà không tạo ra axetat dưới dạng sản phẩm phụ. Theo mục tiêu này, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm việc sử dụng phosphotransbutyrylaza (ptb) và butyrat kinaza (bk) từ *C. acetobutylicum* để thực hiện quá trình biến đổi này thông qua các giai đoạn 10 và 11 trên Fig.1. Operon ptb/bk có nguồn gốc tự nhiên từ *C. acetobutylicum* (các gen 0020 và 0021) đã được tách dòng và biểu hiện ở pZA33. Các dịch chiết từ tế bào chứa cấu trúc thu được được lấy ra và phân tích hai hoạt tính enzym như được mô tả trong sáng chế. Hoạt tính đặc hiệu của BK là xấp xỉ 65 U/mg,

trong khi đó hoạt tính đặc hiệu của PTB là xấp xỉ 5 U/mg. Một đơn vị hoạt tính (U) được định nghĩa là để biến đổi 1 μM cơ chất trong 1 phút ở nhiệt độ trong phòng. Cuối cùng, cấu trúc này được thử nghiệm để tham gia vào quá trình biến đổi axit 4-hydroxybutanoic thành 1,4-butandiol. Các chủng vi sinh vật chủ được biến nạp bằng cấu trúc pZA33-0020-0021 described and pZE13-0002 và so với việc sử dụng *cat2* trong quá trình sản sinh BDO bằng cách sử dụng quy trình hiếu khí được thể hiện trên Fig.5. Chủng BK/PTB đã sinh tổng hợp 1mM 1,4-butandiol, so với 2mM khi sử dụng cat2 (bảng 11). Ngạc nhiên là, các kết quả này phụ thuộc vào liệu chủng vi sinh vật chủ có vùng loại bỏ gen adhE có nguồn gốc tự nhiên hay không.

Bảng 11. Nồng độ 1,4-butandiol tuyệt đối và được chuẩn hóa từ các môi trường nuôi cấy các tế bào biểu hiện gen *adhE2* từ *C. acetobutylicum* ở ZE13 cùng với gen cat2 từ *P. gingivalis* (0034) hoặc các gen PTB/BK từ *C. acetobutylicum* trên pZA33. Các chủng vi sinh vật chủ là MG1655 $lacI^Q$ hoặc MG1655 ΔadhE $lacI^Q$.

Gen	Chủng vi sinh vật chủ	1,4-butandiol (μM)	Mật độ quang (600nm)	1,4-butandiol/Mật độ quang
0034	MG1655 $lacI^Q$	0,827	19,9	0,042
0020+0021	MG1655 $lacI^Q$	0,007	9,8	0,0007
0034	MG1655 ΔadhE $lacI^Q$	2,084	12,5	0,166
0020+0021	MG1655 ΔadhE $lacI^Q$	0,975	18,8	0,052

Quá trình sản sinh BDO từ glucoza

Giai đoạn cuối cùng của quá trình được chứng minh là để biểu hiện cả các phân đoạn của quá trình sản sinh 4-HB và BDO ở *E. coli* và chứng minh quá trình sản sinh BDO trên môi trường chứa lượng tối thiểu glucoza. Các plasmit mới được tạo cấu trúc sao cho tất cả các gen mong muốn thích hợp với hai plasmit này. Nói chung, các gen cat1, adhE và sucD đã được biểu hiện từ pZE13 và cat2 và axit 4-hydroxybutanoic đã được biểu hiện từ pZA33. Các tổ hợp nguồn gen và trình tự gen khác nhau đã được thử nghiệm trên nền MG1655 $lacI^Q$. Các tế bào được sinh trưởng kỵ khí trên môi trường tối thiểu M9 (6,78g/L Na_2HPO_4, 3,0g/L KH_2PO_4, 0,5g/L NaCl, 1,0g/L NH_4Cl, 1mM $MgSO_4$, 0,1mM $CaCl_2$) được bổ sung với 20g/L glucoza, 100mM axit 3-(N-morpholino)propansulfonic (MOPS) để cải thiện dung lượng đệm, 10 μg/mL thiamin và các kháng sinh thích hợp.

0,25mM IPTG được bổ sung vào trong khoảng 1,5 giờ sau khi ủ và các mẫu dịch nổi nuôi cấy được lấy ra để phân tích 1,4-butandiol, axit 4-hydroxybutanoic và suxinat 24 và 48 giờ sau khi ủ. Quá trình sản sinh BDO dường như là phụ thuộc vào trình tự gen (bảng 12). Nồng độ 1,4-butandiol cao nhất là trên 0,5mM, thu được với cat2 được biểu hiện trước tiên, tiếp theo là axit 4-hydroxybutanoic trên pZA33 và cat1 tiếp theo là *P. gingivalis* sucD trên pZE13. Việc bổ sung gen adhE2 của *C. acetobutylicum* ở vị trí cuối trên pZE13 dẫn đến sự cải thiện nhẹ. Hợp chất axit 4-hydroxybutanoic và suxinat cũng đã được sinh tổng hợp ở nồng độ cao hơn.

Bảng 12. Quá trình sản sinh BDO, axit 4-hydroxybutanoic và suxinat ở các chủng *E. coli* tái tổ hợp biểu hiện tổ hợp các gen tham gia vào quá trình sản sinh BDO, sinh trưởng trên môi trường tối thiểu được bổ sung với 20g/L glucoza. Các nồng độ được thể hiện theo mM.

Mẫu	pZE13	pZA33	OD cảm ứng	24 giờ				48 giờ			
				OD 600nm	Suxcinat	4HB	BOD	OD 600nm	Suxcinat	4HB	BOD
1	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,92	1,29	5,44	1,37	0,240	1,24	6,42	1,49	0,280
2	cat1 (0004)-sucD (0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,36	1,11	6,90	1,24	0,011	1,06	7,63	1,33	0,011
3	adhE(0002)-cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,20	0,44	0,34	1,84	0,050	0,60	1,93	2,67	0,119
4	cat1 (0004)-sucD (0035)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1,31	1,90	9,02	0,73	0,073	1,95	9,73	0,82	0,077
5	adhE(0002)-cat1 (0004)- sucD (0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,17	0,45	1,04	1,04	0,008	0,94	7,13	1,02	0,017
6	cat1 (0004)-sucD (0008N)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1,30	1,77	10,47	0,25	0,004	1,80	11,49	0,28	0,003
7	cat1 (0004)-sucD (0035)	cat2(0034)- 4hbd (0036)	1,09	1,29	5,63	2,15	0,461	1,38	6,66	2,30	0,520
8	cat1 (0004)-sucD (0008N)	cat2(0034)- 4hbd (0036)	1,81	2,01	11,28	0,02	0,000	2,24	11,13	0,02	0,000
9	adhE(0002)-cat1 (0004)-sucD (0035)	cat2(0034)- 4hbd (0036)	0,24	1,99	2,02	2,32	0,106	0,89	4,85	2,41	0,186
10	cat1 (0004)-sucD (0035)-adhE(0002)	cat2(0034)- 4hbd (0036)	0,98	1,17	5,30	2,08	0569	1,33	6,15	1,49	0,640
11	adhE(0002)-cat1 (0004)- sucD (0008N)	cat2(0034)- 4hbd (0036)	0,20	0,53	1,38	2,30	0,019	0,91	8,10	0,17	0,034
12	cat1 (0004)-sucD (0008N)-adhE(0002)	cat2(0034)- 4hbd (0036)	2,14	2,73	12,07	0,16	0,000	3,10	11,79	0,01	0,002
13	Chỉ vectơ	Chỉ vectơ	2,11	2,62	9,03	0,01	0,000	3,00	12,05		0,000

Phân tích 1,4-butandiol, axit 4-hydroxybutanoic và suxinat bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GCMS)

Các hợp chất 1,4-butandiol, axit 4-hydroxybutanoic và suxinat trong các mẫu lên men và nuôi cấy tế bào đã được tạo dẫn xuất bằng phản ứng silyl hóa và phân tích định lượng bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GCMS) bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp theo các tài liệu chuyên ngành ((Simonov et al., *J. Anal*

Chem.59:965-971 (2004)). Phương pháp được phát triển này đã chứng minh độ nhạy tuyệt vời dưới 1μM, độ tuyến tính lên đến ít nhất 25mM, cũng như độ chọn lọc và độ lặp lại tuyệt vời.

Quá trình chuẩn bị mẫu được thực hiện như sau: 100μL các mẫu lọc (các bộ lọc bơm tiêm 0,2μm hoặc 0,45μm) ví dụ, các dung dịch canh trường lên men, canh trường tế bào hoặc dung dịch chuẩn, được làm khô trong thiết bị cô trong chân không nhanh Speed Vac Concentrator (Savant SVC-100H) trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ môi trường, tiếp theo bổ sung 20μL dung dịch xyclohexanol 10mM, làm chuẩn nội, trong dimetylformamit. Các hỗn hợp này được lắc và siêu âm trong bể nước (Branson 3510) trong 15 phút để đảm bảo đồng nhất. 100 μL thuốc thử tạo dẫn xuất silyl hóa, N,O-bis(trimetylsilyl)triflo-axetimit (BSTFA) chứa 1% trimetylclosilan, được bổ sung vào và hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 70°C trong 30 phút. Các mẫu được tạo dẫn xuất này được ly tâm trong 5 phút và các dung dịch trong suốt được tiêm trực tiếp vào hệ thống sắc ký khí ghép khối phổ (GCMS). Tất cả các hóa chất và thuốc thử là từ Sigma-Aldrich, với ngoại trừ 1,4-butandiol được mua từ J.T.Baker.

Quá trình sắc ký khí ghép khối phổ được thực hiện trên thiết bị sắc ký khí Agilent 6890N, được trang bị bộ dò chọn lọc khối phổ (MSD) 5973N được vận hành theo nguyên lý ion hóa va chạm điện tử đã được sử dụng để phân tích. Cột mao quản DB-5MS (J&W Scientific, Agilent Technologies), chiều dày tấm mỏng 30m x 0,25mM i.d. x 0,25 μm, được sử dụng. Thiết bị sắc ký khí này được vận hành theo nguyên lý tiêm mẫu phân đoạn với phương thức tiêm 1μL mẫu theo tỷ lệ phân đoạn 20:1. Nhiệt độ buồng tiêm là 250°C. Heli được sử dụng làm khí mang và tốc độ dòng được duy trì ở 1,0 mL/phút. Chương trình gradient nhiệt độ được tối ưu hóa để đảm bảo độ phân gia tuyệt với của các chất phân tích quan tâm và tối thiểu giao diện nền. Ban đầu lò được giữ ở nhiệt độ 80°C trong 1 phút, sau đó tăng lên 120°C với tốc độ 2°C/phút, tiếp theo tăng nhanh đến 320°C ở tốc độ 100°C/phút cuối cùng được giữ trong 6p hút ở nhiệt độ 320°C. Ngăn chuyển giao diện MS được duy trì ở nhiệt độ 280°C. Dữ liệu thu được bằng cách sử dụng các chế độ cài đặt điều chỉnh MS "phổ khối thấp" và khoảng phổ khối nằm trong khoảng từ 30 đến 400m/z. Tổng thời gian phân tích là 29 phút bao gồm 3 phút solvent delay. Thời gian lưu tương ứng là 5,2, 10,5, 14,0 và 18,2 phút đối với xyclohexanol được tạo dẫn xuất BSTFA, 1,4-butandiol, axit 4-hydroxybutanoic và suxinat. Để phân tích định lượng, các đoạn phổ khối

đặc hiệu sau đã được chọn (các sắc ký đồ ion được chọn lọc): m/z 157 đối với chuẩn nội xyclohexanol, 116 đối với 1,4-butandiol và 147 đối với cả axit 4-hydroxybutanoic và suxinat. Đường chuẩn được xây dựng bằng cách sử dụng các dung dịch phân tích từ môi trường lên men hoặc nuôi cấy tế bào tương ứng để phù hợp với nền mẫu càng gần càng tốt. Dữ liệu GCMS được xử lý bằng cách sử dụng phần mềm Environmental Data Analysis ChemStation (Agilent Technologies).

Các kết quả cho thấy rằng hầu hết 4-HB và BDO được sinh tổng hợp đã được đánh dấu đồng vị ^{13}C (Fig.6, các hình bên tay phải). Phổ khối từ chủng đối chứng sinh trưởng trên glucoza không được đánh dấu đồng vị được thể hiện để so sánh (Fig.6, các hình bên tay trái). Lưu ý rằng các píc quan sát được là để chỉ các đoạn của phân tử được tạo dẫn xuất chứa số lượng các nguyên tử cacbon khác nhau từ chất chuyển hóa. Thuốc thử tạo dẫn xuất hóa cũng đóng góp một số nguyên tử cacbon và silic mà phân bố trong tự nhiên, do đó kết quả định lượng không chính xác.

Quá trình sản sinh BDO từ 4-HB sử dụng các quá trình thay thế

Các quá trình thay thế khác nhau được thử nghiệm để sinh tổng hợp 1,4-butandiol. Quá trình này bao gồm việc sử dụng enzym sucCD của *E. coli* có nguồn gốc tự nhiên để biến đổi suxinat thành suxinyl-CoA (bảng 13, các dòng 2-3), việc sử dụng alpha–ketoglutarat decarboxylaza trong quá trình alpha-ketoglutarat (bảng 13, dòng 4) và việc sử dụng PTB/BK làm quá trình thay thế để tạo thành dẫn xuất CoA của axit 4-hydroxybutanoic (bảng 13, dòng 1). Các chủn được tạo ra chứa các plasmit biểu hiện các gen này được thể hiện trên Bảng 13, bao gồm các biến thể này. Các kết quả cho thấy rằng trong tất cả các trường hợp, quá trình sản sinh 4-HB và BDO đã xuất hiện (bảng 13).

Bảng 13. Quá trình sản sinh BDO, axit 4-hydroxybutanoic và suxinat ở các chủng *E. coli* tái tổ hợp chứa các gen mã hóa cho các biến thể tham gia vào quá trình sản sinh BDO, sinh trưởng kỵ khí trên môi trường tối thiểu được bổ sung với 20g/L glucoza và được thu nhận sau 24 giờ cảm ứng bằng 0,1mM IPTG. Các nồng độ được thể hiện theo mM.

Các gen trên pZE13	Các gen trên pZA33	Suxinat	axit 4-hydroxybutanoic	BDO
0002+0004+0035	0020n-0021n-0036	0,336	2,91	0,230
0038+0035	0034-0036	0,814	2,81	0,126
0038+0035	0036-0034	0,741	2,57	0,114
0035+0032	0034-0036	5,01	0,538	0,154

Ví dụ 3

Quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic, gama-butyrolacton và 1,4-butandiol

Ví dụ này mô tả quá trình sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic, gama-butyrolacton và 1,4-butandiol bằng cách sử dụng các quy trình lên men và quy trình sinh học khác.

Phương pháp để tích hợp giai đoạn lên men axit 4-hydroxybutanoic vào toàn bộ quá trình để sinh tổng hợp gama-butyrylacton (GBL), 1,4-butandiol (BDO) và tetrahydrofuran (THF) tinh khiết được mô tả dưới đây. Do axit 4-hydroxybutanoic và gama-butyrylacton là ở trạng thái cân bằng, nên canh trường lên men sẽ chứa cả hai hợp chất này. Ở pH thấp trạng thái cần bằng này sẽ được chuyển dịch theo hướng có lợi cho gama-butyrylacton. Do đó, quá trình lên men có thể vận hành ở pH 7,5 hoặc thấp hơn, nói chung ở pH 5,5 hoặc thấp hơn. Sau khi loại sinh khối, khối sản phẩm được đưa vào giai đoạn phân tách trong đó gama-butyrylacton được loại bỏ và khối sản phẩm còn lại giàu axit 4-hydroxybutanoic được tái chế. Cuối cùng, gama-butyrylacton được chưng cất để loại tạp chất bất kỳ. Quá trình này vận hành theo một trong ba phương thức sau: 1) lên men bổ sung dinh dưỡng và phân tách theo mẻ; 2) lên men bổ sung dinh dưỡng theo mẻ và phân tách liên tục; 3) lên men liên tục và phân tách liên tục. Hai phương đầu tiên trong số các phương thức này được thể hiện dưới dạng biểu đồ trên Fig.7. Các quá trình lên men được tích hợp được mô tả dưới đây cũng được sử dụng cho các tế bào sinh tổng hợp 1,4-butandiol theo sáng chế để sinh tổng hợp 1,4-butandiol và sau đó là nhóm hợp chất BOD.

Quy trình lên men sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic/gama-butyrylacton (theo mẻ)

Vi sinh vật sản sinh được sinh trưởng trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 10L được sục hỗn hợp N_2/CO_2, sử dụng 5L canh trường chứa 5g/L kali phosphat, 2,5g/L amoni clorit, 0,5g/L magiê sulfat và 30g/L dung dịch nước ngâm ngô và nồng độ glucoza ban đầu là 20g/L. Khi các tế bào sinh trưởng và sử dụng glucoza, glucoza 70% bổ sung được nạp vào thiết bị phản ứng sinh học này ở tốc độ xấp xỉ cân bằng tiêu thụ glucoza. Nhiệt độ của thiết bị phản ứng sinh học được duy trì ở 30^0C. Quá trình sinh trưởng tiếp tục trong khoảng 24 giờ, cho đến khi axit 4-hydroxybutanoic đạt được nồng độ là nằm trong khoảng từ 20-200g/L, với mật độ tế bào là nằm trong khoảng từ 5 đến 10g/L. Độ pH không được kiểm soát và thường sẽ giảm đến pH 3-6 do kết thúc quá trình. Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, các thành phần lên men được đưa vào thiết bị phân tách tế bào (ví dụ, ly tâm) để loại bỏ tế bào và xác tế bào và canh trường lên men được đưa vào thiết bị phân tách sản phẩm. Quá trình phân lập axit 4-hydroxybutanoic và/hoặc gama-butyrylacton sẽ được thực hiện theo các quy trình phân tách tiêu chuẩn được sử dụng trong lĩnh vực này để phân tách các sản phẩm hữu cơ ra khỏi các dung dịch nước pha loãng, như quy trình chiết lỏng-lỏng bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ đồng tan với nước (ví dụ, toluen) để thu được dung dịch hữu cơ chứa axit 4-hydroxybutanoic/gama-butyrylacton. Sau đó dung dịch thu được được chưng chất theo các phương pháp tiêu chuẩn để loại và tái chế dung môi hữu cơ và để thu được gama-butyrylacton (nhiệt độ sôi 204-205°C) được phân lập dưới dạng chất lỏng tinh khiết.

Quy trình lên men sinh tổng hợp axit 4-hydroxybutanoic/gama-butyrylacton (liên tục hoàn toàn)

Trước hết vi sinh vật sản sinh được nuôi cấy theo phương thức lô mẻ bằng cách sử dụng thiết bị và thành phần môi trường được mô tả nêu trên, ngoại trừ nồng độ glucoza ban đầu là 30-50g/L. Khi glucoza được tiêu thụ hết, môi trường nuôi cấy chứa thành phần tương tự được bổ sung liên tục vào ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,5L/giờ đến 1L/giờ và chất lỏng được chiết ra ở cùng tốc độ. Nồng độ axit 4-hydroxybutanoic trong thiết bị phản ứng sinh học này vẫn duy trì hằng định ở 30-40g/L và mật độ tế bào vẫn duy trì hằng định nằm trong khoảng từ 3 đến 5g/L. Nhiệt độ được duy trì ở 300C và pH được duy trì ở 4,5 bằng cách sử dụng NaOH và HCL đặc, khi được yêu cầu. Thiết bị phản ứng sinh học này được vận hành liên tục trong một tháng, với các mẫu được lấy ra hàng ngày để đảm bảo đồng nhất về nồng độ axit 4-hydroxybutanoic. Theo phương thức liên tục, các thành phần

lên men được loại bỏ hằng định khi môi trường nuôi cấy mới được bổ sung. Sinh khối chứa các tế bào, môi trường và các sản phẩm axit 4-hydroxybutanoic và/hoặc gama-butyrylacton, sau đó được trải qua quá trình phân tách sản phẩm liên tục, có hoặc không có quá trình loại bỏ tế bào và xác tế bào và sẽ được thực hiện theo các quy trình phân tách tiêu chuẩn được sử dụng trong lĩnh vực này để phân tách các sản phẩm hữu cơ ra khỏi các dung dịch nước pha loãng, như phương pháp chiết lỏng-lỏng liên tục bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ đồng tan với nước (ví dụ, toluen) để thu được dung dịch hữu cơ chứa axit 4-hydroxybutanoic/gama-butyrylacton. Sau đó dung dịch thu được được chưng chất theo các phương pháp tiêu chuẩn để loại và tái chế dung môi hữu cơ và để thu được gama-butyrylacton (nhiệt độ sôi 204-205°C) được phân lập dưới dạng chất lỏng tinh khiết.

Quá trình khử gama-butyrylacton

Khi gama-butyrylacton được phân lập và tinh chế như được mô tả nêu trên sau đó, gama-butyrylacton sẽ được trải qua các quá trình khử như đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này (tài liệu tham khảo) để tổng hợp 1,4-butandiol hoặc tetrahydrofuran (THF) hoặc hỗn hợp của chúng. Các chất xúc tác hydro hóa đồng nhất hoặc không đồng nhất kết hợp với gama-butyrylacton trong điều kiện áp suất hydro được biết đến rộng rãi để thu được các sản phẩm 1,4-butandiol hoặc tetrahydrofuran (THF) hoặc hỗn hợp của chúng. Điều quan trọng cần lưu ý là hỗn hợp sản phẩm axit 4-hydroxybutanoic/gama-butyrylacton mà được phân tách ra khỏi canh trường lên men, như được mô tả nêu trên, có thể được đưa trực tiếp vào các quá trình khử tương tự này, trước khi phân lập và tinh chế gama-butyrylacton để thu được các sản phẩm 1,4-butandiol hoặc tetrahydrofuran hoặc hỗn hợp của chúng. Các sản phẩm thu được, 1,4-butandiol và tetrahydrofuran sau đó được phân lập và tinh chế theo các quy trình đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này.

Quy trình lên men và hydro hóa để sản sinh 1,4-butandiol hoặc tetrahydrofuran có định hướng (theo mẻ)

Các tế bào được sinh trưởng trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 10L được sục hỗn hợp N_2/CO_2, sử dụng 5L canh trường chứa 5g/L kali phosphat, 2,5g/L amoni clorit, 0,5g/L magiê sulfat và 30g/L dung dịch nước ngâm ngô và nồng độ glucoza ban đầu là 20g/L. Khi các tế bào sinh trưởng và sử dụng glucoza, glucoza 70% bổ sung được nạp vào thiết bị phản ứng sinh học này ở tốc độ xấp xỉ cân bằng tiêu thụ glucoza. Nhiệt độ

của thiết bị phản ứng sinh học được duy trì ở 30^0C. Quá trình sinh trưởng tiếp tục trong khoảng 24 giờ, cho đến khi axit 4-hydroxybutanoic đạt được nồng độ là nằm trong khoảng từ 20-200g/L, với mật độ tế bào là nằm trong khoảng từ 5 đến 10g/L. Độ pH không được kiểm soát và thường sẽ giảm đến pH 3-6 do kết thúc quá trình. Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, các thành phần lên men được đưa vào thiết bị phân tách tế bào (ví dụ, ly tâm) để loại bỏ tế bào và xác tế bào và canh trường lên men được đưa vào thiết bị khử (ví dụ, bình hydro hóa), ở đó hỗn hợp axit 4-hydroxybutanoic/gama-butyrylacton được khử trực tiếp thành hoặc 1,4-butandiol hoặc tetrahydrofuran hoặc hỗn hợp của chúng. Sau khi hoàn thành quá trình khử, các thành phần trong thiết bị phản ứng được chuyển vào thiết bị phân tách sản phẩm. Quá trình phân lập 1,4-butandiol và/hoặc tetrahydrofuran sẽ được thực hiện theo các quy trình phân tách tiêu chuẩn được sử dụng trong lĩnh vực này để phân tách các sản phẩm hữu cơ ra khỏi các dung dịch nước pha loãng, như quy trình chiết lỏng-lỏng bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ đồng tan với nước (ví dụ, toluen) để thu được dung dịch hữu cơ chứa 1,4-butandiol và/hoặc tetrahydrofuran. Sau đó dung dịch thu được được chưng chất theo các phương pháp tiêu chuẩn để loại và tái chế dung môi hữu cơ và để thu được 1,4-butandiol và/hoặc tetrahydrofuran được phân lập dưới dạng các chất lỏng tinh khiết.

Quy trình lên men và hydro hóa sinh tổng hợp 1,4-butandiol hoặc tetrahydrofuran có định hướng (liên tục hoàn toàn)

Đầu tiên các tế bào được nuôi cấy theo phương thức lô mẻ bằng cách sử dụng thiết bị và thành phần môi trường được mô tả nêu trên, ngoại trừ nồng độ glucoza ban đầu là 30-50g/L. Khi glucoza được tiêu thụ hết, môi trường nuôi cấy chứa thành phần tương tự được bổ sung liên tục vào ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,5L/giờ đến 1L/giờ và chất lỏng được chiết ra ở cùng tốc độ. Nồng độ axit 4-hydroxybutanoic trong thiết bị phản ứng sinh học này vẫn duy trì hằng định ở 30-40g/L và mật độ tế bào vẫn duy trì hằng định nằm trong khoảng từ 3 đến 5g/L. Nhiệt độ được duy trì ở 30^0C và pH được duy trì ở 4,5 bằng cách sử dụng NaOH và HCL đặc, khi được yêu cầu. Thiết bị phản ứng sinh học này được vận hành liên tục trong một tháng, với các mẫu được lấy ra hàng ngày để đảm bảo đồng nhất về nồng độ axit 4-hydroxybutanoic. Theo phương thức liên tục, các thành phần lên men được loại bỏ hằng định khi môi trường nuôi cấy mới được bổ sung. Sinh khối, chứa các tế bào, môi trường và các sản phẩm axit 4-hydroxybutanoic và/hoặc gama-

butyrylacton, sau đó được chuyển vào thiết bị phân tách tế bào (ví dụ, ly tâm) để loại bỏ tế bào và xác tế bào và canh trường lên men được chuyển vào thiết bị khử liên tục (ví dụ, bình hydro hóa), ở đó hỗn hợp axit 4-hydroxybutanoic/gama-butyrylacton được khử trực tiếp thành hoặc 1,4-butandiol hoặc tetrahydrofuran hoặc hỗn hợp của chúng. Sau khi hoàn thành quá trình khử, các thành phần trong thiết bị phản ứng sinh học này được chuyển vào thiết bị phân tách sản phẩm liên tục. Quá trình phân lập 1,4-butandiol và/hoặc tetrahydrofuran sẽ được thực hiện theo các quy trình phân tách tiêu chuẩn được sử dụng trong lĩnh vực này để phân tách các sản phẩm hữu cơ ra khỏi các dung dịch nước pha loãng, như quy trình chiết lỏng-lỏng bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ đồng tan với nước (ví dụ, toluen) để thu được dung dịch hữu cơ chứa 1,4-butandiol và/hoặc tetrahydrofuran. Sau đó dung dịch thu được được chưng chất theo các phương pháp tiêu chuẩn để loại và tái chế dung môi hữu cơ và để thu được 1,4-butandiol và/hoặc tetrahydrofuran được phân lập dưới dạng các chất lỏng tinh khiết.

Quy trình lên men sinh tổng hợp 1,4-butandiol có định hướng (theo mẻ)

Vi sinh vật sản sinh được sinh trưởng trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 10L được sục hỗn hợp N_2/CO_2, sử dụng 5L canh trường chứa 5g/L kali phosphat, 2,5g/L amoni clorit, 0,5g/L magiê sulfat và 30g/L dung dịch nước ngâm ngô và nồng độ glucoza ban đầu là 20g/L. Khi các tế bào sinh trưởng và sử dụng glucoza, glucoza 70% bổ sung được nạp vào thiết bị phản ứng sinh học này ở tốc độ xấp xỉ cân bằng tiêu thụ glucoza. Nhiệt độ của thiết bị phản ứng sinh học được duy trì ở 30^0C. Quá trình sinh trưởng tiếp tục trong khoảng 24 giờ, cho đến khi 1,4-butandiol đạt nồng độ nằm trong khoảng từ 20 đến 200g/L, với mật độ tế bào nói chung nằm trong khoảng từ 5 đến 10g/L. Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, các thành phần lên men được đưa vào thiết bị phân tách tế bào (ví dụ, ly tâm) để loại bỏ tế bào và xác tế bào và canh trường lên men được đưa vào thiết bị phân tách sản phẩm. Quá trình phân lập 1,4-butandiol sẽ được thực hiện theo các quy trình phân tách tiêu chuẩn được sử dụng trong lĩnh vực này để phân tách các sản phẩm hữu cơ ra khỏi các dung dịch nước pha loãng, như quy trình chiết lỏng-lỏng bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ đồng tan với nước (ví dụ, toluen) để thu được dung dịch hữu cơ chứa 1,4-butandiol. Sau đó dung dịch thu được được chưng chất theo các phương pháp tiêu chuẩn để loại và tái chế dung môi hữu cơ và để thu được 1,4-butandiol (nhiệt độ sôi 228-229^{o}C) được phân lập dưới dạng chất lỏng tinh khiết.

Quy trình lên men sinh tổng hợp 1,4-butandiol có định hướng (liên tục hoàn toàn)

Trước hết vi sinh vật sản sinh được nuôi cấy theo phương thức lô mẻ bằng cách sử dụng thiết bị và thành phần môi trường được mô tả nêu trên, ngoại trừ nồng độ glucoza ban đầu là 30-50g/L. Khi glucoza được tiêu thụ hết, môi trường nuôi cấy chứa thành phần tương tự được bổ sung liên tục vào ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,5L/giờ đến 1L/giờ và chất lỏng được chiết ra ở cùng tốc độ. Nồng độ 1,4-butandiol trong thiết bị phản ứng sinh học này được duy trì hằng định ở 30-40g/L và mật độ tế bào vẫn duy trì hằng định nằm trong khoảng từ 3 đến 5g/L. Nhiệt độ được duy trì ở 300C và pH được duy trì ở 4,5 bằng cách sử dụng NaOH và HCL đặc, khi được yêu cầu. Thiết bị phản ứng sinh học này được vận hành liên tục trong một tháng, với các mẫu được lấy ra hàng ngày để đảm bảo đồng nhất về nồng độ 1,4-butandiol. Theo phương thức liên tục, các thành phần lên men được loại bỏ hằng định khi môi trường nuôi cấy mới được bổ sung. Sinh khối chứa các tế bào, môi trường và sản phẩm 1,4-butandiol, sau đó được trải qua quá trình phân tách sản phẩm liên tục, có hoặc không có quá trình loại bỏ tế bào và xác tế bào và sẽ được thực hiện theo các quy trình phân tách tiêu chuẩn được sử dụng trong lĩnh vực này để phân tách các sản phẩm hữu cơ ra khỏi các dung dịch nước pha loãng, như phương pháp chiết lỏng-lỏng liên tục bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ đồng tan với nước (ví dụ, toluen) để thu được dung dịch hữu cơ chứa 1,4-butandiol. Sau đó dung dịch thu được được chưng chất theo các phương pháp tiêu chuẩn để loại và tái chế dung môi hữu cơ và để thu được 1,4-butandiol (nhiệt độ sôi 228-229^{o}C) được phân lập dưới dạng chất lỏng tinh khiết (mpt 20^{o}C).

Ví dụ 4

Ví dụ về các quá trình sản sinh BDO

Ví dụ này mô tả các enzym và gen tương ứng tham gia vào các quá trình sản sinh 1,4-butandiol (BDO).

Ví dụ về các quá trình sản sinh BDO được thể hiện trên các Fig.8-13. Các quá trình được bộc lộ trên các Fig.8-13 là các quá trình biến đổi từ các chất trung gian chuyển hóa chủ yếu thông thường thành 1,4-butandiol. Tất cả các quá trình biến đổi được bộc lộ trên các Fig.8-13 bao gồm 18 loại phản ứng biến đổi 18 nói chung được thể hiện ở bảng 14. Một số gen tiềm năng đã được mô tả đặc tính sinh hóa ở mỗi loại phản ứng được mô tả

dưới đây. Các gen cụ thể đã được liệt kê và có thể được sử dụng để xúc tác các quá trình biến đổi thích hợp trên các Fig.9-13 khi được tách dòng và biểu hiện ở sinh vật chủ. Ví dụ về ba gen thiết yếu cho mỗi giai đoạn quan trọng trên các Fig.9-13 được đề xuất trong các bảng 15-23 (tham khảo dưới đây). Ví dụ về các gen được đề xuất trong các quá trình được bộc lộ trên Fig.8 đã được mô tả trong sáng chế.

Bảng 14. Các loại enzym cần thiết để biến đổi các chất trung gian chuyển hóa chủ yếu thông thường thành 1,4-butandiol. Ba chữ số đầu tiên của mỗi cụm ký tự tương ứng với ba chữ số đầu tiên của mã phân loại enzym EC thể hiện loại phản ứng biến đổi không phụ thuộc vào tính đặc hiệu với cơ chất.

Mã phân loại	**Chức năng**
1.1.1.a	Oxidoreductaza (khử keton thành hydroxyl hoặc aldehyt thành rượu)
1.1.1.c	Oxidoreductaza (2 bước, khử axyl-CoA thành rượu)
1.2.1.b	Oxidoreductaza (khử axyl-CoA thành aldehyt)
1.2.1.c	Oxidoreductaza (khử carboxyl, 2-oxo axit thành axyl-CoA)
1.2.1.d	Oxidoreductaza (phosphoryl hóa/khử phosphoryl hóa)
1.3.1.a	Oxidoreductaza tác động trên các chất cho CH-CH
1.4.1.a	Oxidoreductaza tác động lên các axit amin
2.3.1.a	Axyltransferaza (chuyển nhóm phosphat)
2.6.1.a	Aminotransferaza
2.7.2.a	Phosphotransferaza, chất nhận nhóm carboxyl
2.8.3.a	Coenzym-A transferaza
3.1.2.a	Thioleste hydrolaza (đặc hiệu với CoA)
4.1.1.a	Carboxy-lyaza
4.2.1.a	Hydro-lyaza
4.3.1.a	Amoniac-lyaza
5.3.3.a	Isomeraza
5.4.3.a	Aminomutaza
6.2.1.a	Axit-thiol ligaza

1.1.1.a-Oxidoreductaza (khử aldehyt thành rượu hoặc keton thành hydroxyl)

Khử aldehyt thành rượu

Ví dụ về các gen mã hóa các enzym xúc tác quá trình biến đổi aldehyt thành rượu, bao gồm, rượu dehydrogenaza hoặc aldehyt reductaza tương đương, bao gồm gne *alrA* mã hóa rượu mạch trung bình dehydrogenaza đối với C2-C14 (Tani et al. *Appl.Environ.Microbiol.* 66:5231-523,5 (2000)), gen *ADH2* từ *Saccharomyces cerevisiae* (Atsumi et al. *Nature* 4,51:86-89 (2008)), gen *yqhD* từ *E. coli* đặc hiệu hơn đối với các phân tử có mạch cacbon dài hơn C(3) (Sulzenbacher et al. *Journal ofmolecular Biology* 342:489-502 (2004)) và gen *bdh* I và *bdh* II từ *C. acetobutylicum* biến đổi butyryaldehyt thành butanol (Walter et al. *Journal of Bacteriology* 174:7149-71,58 (1992)). Các trình tự protein tương ứng với mỗi sản phẩm gen này, nếu có, có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số truy cập GenBank sau:

alrA	BAB12273.1	*Acinetobacter* sp. chủng M-1
ADH2	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*
yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*
bdh I	NP_349892.1	*Clostridium acetobutylicum*
bdh II	NP_349891.1	*Clostridium acetobutylicum*

Các enzym biểu hiện hoạt tính của 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza (EC 1.1.1,61) cũng thuộc loại biến đổi này. Các enzym này đã được mô tả đặc tính ở *Ralstonia eutropha* (Bravo et al. *J.Forensic Sci.* 49:379-387 (2004), *Clostridium kluyveri* (Wolff et al. *Protein Expr.Purif.* 6:206-212 (1995)) và *Arabidopsis thaliana* (Breitkreuz et al. *J.Biol.Chem.* 278:415,52-415,56 (2003)).

4hbd	YP_726053.1	*Ralstonia eutropha* H16
4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri* DSM 555
4hbd	Q94B07	*Arabidopsis thaliana*

Ví dụ về một enzym khác là 3-hydroxyisobutyrat dehydrogenaza xúc tác quá trình oxi hóa thuận nghịch 3-hydroxyisobutyrat thành metylmalonat semialdehyt. Enzym này tham gia vào quá trình phân hủy valin, leuxin và isoleuxin và đã được phát hiện ở chủng, sinh vật nhân thật và động vật có vú. Enzym này được mã hóa bởi *P84067* từ *Thermus thermophilus* HB8 có cấu trúc đặc trưng (Lokanath et al. *Jmol Biol* 3,52:905-17 (2005)). Khả năng xúc tác thuận nghịch của enzym 3-hydroxyisobutyrat dehydrogenaza người đã được chứng minh bằng cách sử dụng cơ chất được đánh dấu đồng vị (Manning et al. *Biochem J* 231:481-484 (1985)). Các enzym bổ sung mã hóa cho enzym này bao gồm gen

3hidh ở *Homo sapiens* (Hawes et al. *Methods Enzymol.* 324:218-228 (2000)) và *Oryctolagus cuniculus* (Chowdhury et al. *Biosci.Biotechnol Biochem.* 60:2043-2047 (1996); Hawes et al. *Methods Enzymol.* 324:218-228 (2000)), gen *mmsb* ở *Pseudomonas aeruginosa* và gen *dhat* ở *Pseudomonas putida* (Aberhart et al. *J Chem.Soc. [Perkin 1]* 6:1404-1406 (1979); Chowdhury et al. *Biosci.Biotechnol Biochem.* 67:438-441 (2003); Chowdhury et al. *Biosci.Biotechnol Biochem.* 60:2043-2047 (1996)).

P84067	P84067	*Thermus thermophilus*
mmsb	P28811.1	*Pseudomonas aeruginosa*
dhat	Q59477.1	*Pseudomonas putida*
3hidh	P31937.2	*Homo sapiens*
3hidh	P32185.1	*Oryctolagus cuniculus*

Một số enzym 3-hydroxyisobutyrat dehydrogenaza cũng đã được chứng minh là có khả năng biến đổi malonic semialdehyt thành axit 3-hydroxyproprionic (3-HP). Ba gen tiềm năng thể hiện hoạt tính này bao gồm *mmsb* từ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1(62), *mmsb* từ *Pseudomonas putida* KT2440 (Liao et al., US Publication 2005/0221466) và *mmsb* từ *Pseudomonas putida E23* (Chowdhury et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 60:2043-2047 (1996)). Enzym có hoạt tính 3-hydroxybutyrat dehydrogenaza ở *Alcaligens faecalis* M3A cũng đã được xác định (Gokam et al., US Patent No. 7,393,676; Liao et al., US Publication No. 2005/0221466). Gen bổ sung tiềm năng từ các vi sinh vật khác bao gồm *Rhodobacter spaeroides* có thể được suy luận từ độ tương đồng về trình tự.

mmsb	AAA25892.1	*Pseudomonas aeruginosa*
mmsb	NP_252259.1	*Pseudomonas aeruginosa* PAO1
mmsb	NP_746775.1	*Pseudomonas putida* KT2440
mmsb	JC7926	*Pseudomonas putida* E23
orfB1	AAL26884	*Rhodobacter spaeroides*

Quá trình biến đổi malonic semialdehyt thành axit 3-hydroxyproprionic cũng có thể được thực hiện bởi hai enzym khác: 3-hydroxypropionat dehydrogenaza phụ thuộc NADH và malonat semialdehyt reductaza phụ thuộc NADPH. Enzym 3-hydroxypropionat dehydrogenaza phụ thuộc NADH được cho là tham gia vào quá trình sản sinh beta-alanin từ propionat ở chủng và thực vật (Rathinasabapathi, B. *Journal of Plant Pathology* 159:671-674 (2002); Stadtman, E. R. *J.Am.Chem.Soc.* 77:5765-5766 (195,5)). Cho đến

nay, enzym này chưa từng được liên hợp với gen ở vi sinh vật bất kỳ. Enzym malonat semialdehyt reductaza phụ thuộc NADPH xúc tác phản ứng thuận nghịch ở chủng tự dưỡng cố định CO_2. Mặc dù hoạt tính enzym đã được phát hiện ở *Metallosphaera sedula*, danh pháp gen vẫn chưa được biết đến (Alber et al. *J.Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006)).

Khử keton thành hydroxyl.

Mọt số enzym rượu dehydrogenaza có khả năng biến đổi keton thành nhóm chức hydroxyl. Hai enzym này từ *E. coli* được mã hóa bởi malat dehydrogenaza (*mdh*) và lactat dehydrogenaza (*ldhA*). Ngoài ra, lactat dehydrogenaza từ *Ralstonia eutropha* đã được chứng minh là có hoạt tính cao đối với các cơ chất có chiều dài mạch cacbon khác nhau như lactat, 2-oxobutyrat, 2-oxopentanoat và 2-oxoglutarat (Steinbuchel, A. and H. G. Schlegel *Eur.J.Biochem.* 130:329-334 (1983)). Quá trình biến đổi alpha-ketoadipat thành alpha-hydroxyadipat có thể được xúc tác bởi 2-ketoadipat reductaza, enzym này được ghi nhận là được tìm thấy ở chuột và nhau thai người (Suda et al. Arch.Biochem.Biophys. 176:610-620 (1976); Suda et al. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 77:586-591 (1977)). Enzym bổ sung tiềm năng cho giai đoạn này là 3-hydroxybutyrat dehydrogenaza ở ty thể (*bdh*) từ tim người đã được tách dòng và mô tả đặc điểm (Marks et al. *J.Biol.Chem.* 267:15459-15463 (1992)). Enzym này là dehydrogenaza tác dụng trên cơ chất 3-hydroxyaxit. Ví dụ khác về rượu dehydrogenaza biến đổi axeton thành isopropanol như đã được thể hiện ở *C. beijerinckii* (Ismaiel et al. *J.Bacteriol.* 175:5097-510,5 (1993)) và *T. brockii* (Lamed et al. *Biochem. J.* 195:183-190 (1981); Peretz and Burstein *Biochemistry* 28:6549-6555 (1989)).

mdh	AAC76268.1	*Escherichia coli*
ldhA	NP_415898.1	*Escherichia coli*
ldh	YP_725182.1	*Ralstonia eutropha*
bdh	AAA58352.1	*Homo sapiens*
adh	AAA231992	*Clostridium beijerinckii* NRRL B593
adh	P14941.1	*Thermoanaerobacter brockii* HTD4

Ví dụ về enzym 3-hydroxyaxyl dehydrogenaza biến đổi axetoaxetyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA bao gồm *hbd* từ *C. acetobutylicum* (Boynton et al. *Journal of Bacteriology* 178:3015-3024 (1996)), *hbd* từ *C. beijerinckii* (Colby et al. *Appl*

Environ.Microbiol 58:3297-3302 (1992)) và một số enzym tương tự từ *Metallosphaera sedula* (Berg et al. Archaea. Science. 318:1782-1786 (2007)).

hbd	NP_349314.1	*Clostridium acetobutylicum*
hbd	AAM14586.1	*Clostridium beijerinckii*
Msed_1423	YP_001191505	*Metallosphaera sedula*
Msed_0399	YP_001190500	*Metallosphaera sedula*
Msed_0389	YP_001190490	*Metallosphaera sedula*
Msed_1993	YP_001192057	*Metallosphaera sedula*

1.1.1.c-Oxidoredutaza (2 bước, khử axyl-CoA thành rượu)

Ví dụ về các oxidoreductaza 2 bước biến đổi axyl-CoA thành rượu bao gồm các enzym biến đổi các cơ chất như axetyl-CoA thành etanol (ví dụ, *adhE* from *E. coli* (Kessler et al. *FEBS.Lett.* 281:59-63 (1991)) và butyryl-CoA thành butanol (ví dụ, *adhE2* từ *C. acetobutylicum* (Fontaine et al. *J.Bacteriol.* 184:821-830 (2002)). Ngoài khả năng khử axetyl-CoA thành etanol, enzym này được mã hóa bởi *adhE* ở *Leuconostoc mesenteroides* cũng đã được chứng minh là có khả năng oxi hóa hợp chất isobutyraldehyt mạch nhánh thành isobutyryl-CoA (Kazahaya et al. *J.Gen.Appl.Microbiol.* 18:43-55 (1972); Koo et al. Biotechnol Lett. 27:505-510 (2005)).

adhE	NP_415757.1	*Escherichia coli*
adhE2	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*
adhE	AAV66076.1	*Leuconostoc mesenteroides*

Ví dụ khác về enzym có thể biến đổi malonyl-CoA thành axit 3-hydroxyproprionic. Enzym phụ thuộc NADPH có hoạt tính này đã được mô tả đặc tính ở *Cloflexus aurantiacus* trong đó, enzym này tham gia vào chu trình 3-hydroxypropionat (Hugler et al., *J.Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002); Strauss and Fuchs, *Eur.J.Biochem.* 215:633-643 (1993)). Enzym này có trọng lượng phân tử là 300 kDa, có tính đặc hiệu cơ chất cao có độ tương đồng về tình tự thấp so với các oxidoreductaza đã biết khác (Hugler et al., *J.Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002)). Chưa từng có enzyme nào trong các vi sinh vật khác thể hiện khả năng xúc tác phản ứng đặc hiệu này; tuy nhiên có bằng chứng từ các phần mềm tin sinh học cho thấy các vi sinh vật khác này có thể có các quá trình tương tự (Klatt et al., *Environ.Microbiol.* 9:2067-2078 (2007)). Enzym tiềm năng trong các vi sinh vật

khác bao gồm *Roseiflexus castenholzii*, *Erythrobacter sp. NAP1* and marine gama proteobacterium HTCC2080 có thể được suy luận từ độ tương đồng về trình tự.

mcr	AAS20429.1	*Cloflexus aurantiacus*
Rcas_2929	YP_001433009.1	*Roseiflexus castenholzii*
NAP1_02720	ZP_01039179.1	*Erythrobacter sp. NAP1*
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	marine gama proteobacterium HTCC2080

Các phân tử axyl -CoA mạch dài có thể bị khử bởi các enzym như jojoba (*Simmondsia chinensis*) *FAR* mã hóa axyl-CoA reductaza béo tạo ra rượu. Sự biểu hiện quá mức của enzym này ở *E. coli* tạo ra hoạt tính FAR activity và sự tích tụ rượu béo (Metz et al. *Plant Physiology* 122:635-644) 2000)).

FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*

1.2.1.b-Oxidoreductaza (khử axyl-CoA thành aldehyt)

Một số axyl-CoA dehydrogenaza có khả năng khử axyl-CoA thành các hợp chất aldehyt tương ứng của nó. Ví dụ về các gen mã hóa quá trình sản sinh BDO này bao gồm gen *acrl* của *Acinetobacter calcoaxeticus* mã hóa axyl-CoA reductaza béo (Reiser and Somerville, *J. Bacteriology* 179:2969-297,5 (1997)), *Acinetobacter sp. M-1* axyl-CoA reductaza béo (Ishige et al. *Appl.Environ.Microbiol.* 68:1192-119,5 (2002)) và suxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc NADP và CoA được mã hóa bởi gen *sucD* ở *Clostridium kluyveri* (Sohling and Gottschalk *J Bacteriol* 178:871-80 (1996); Sohling and Gottschalk *J Bacteriol.* 178:871-880 (1996)). *SucD* của *P. gingivalis* là một suxinat semialdehyt dehydrogenaza khác (Takahashi et al. *J.Bacteriol.* 182:4704-4710 (2000)). Enzym này axyl hóa axetaldehyt dehydrogenaza ở *Pseudomonas sp*, được mã hóa bởi *bphG*, là duy nhất do enzym này đã được chứng minh để oxi hóa và axyl hóa axetaldehyt, propionaldehyt, butyraldehyt, isobutyraldehyt và formaldehyt (Powlowski et al. *J Bacteriol.* 175:377-385 (1993)).

acr1	YP_047869.1	*Acinetobacter calcoaxeticus*
acr1	AAC45217	*Acinetobacter baylyi*
acr1	BAB85476.1	*Acinetobacter* sp. Chủng M-1
sucD	P38947.1	*Clostridium kluyveri*
sucD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*
bphG	BAA03892.1	*Pseudomonas sp*

Loại enzym bổ sung biến đổi axyl-CoA thành các hợp chất aldehyt tương ứng của nó là malonyl-CoA reductaza biến đổi malonyl-CoA thành malonic semialdehyt. Malonyl-CoA reductaza là enzym quan trọng trong quá trình cố định cacbon tự dưỡng thông qua chu trình 3-hydroxypropionat ở chủng cổ ưa nhiệt, ưa axit (Berg et al. *Science* 318:1782-1786 (2007); Thauer, R. K. *Science* 318:1732-1733 (2007)). Enzym này sử dụng NADPH làm đồng nhân tố và là đặc trưng ở *Metallosphaera* và *Sulfolobus spp* (Alber et al. *J.Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); Hugler et al. *J.Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002)). Enzym này được mã hóa bởi *Msed_0709* ở *Metallosphaera sedula* (Alber et al. *J.Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); Berg et al. *Science* 318:1782-1786 (2007)). Gen mã hóa malonyl-CoA reductaza từ *Sulfolobus tokodaii* được tách dòng và biểu hiện không tương đồng ở *E. coli* (Alber et al. *J.Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006)). Mặc dù chức năng aldehyt dehydrogenaza của các enzym này là tương tự với dehydrogenaza hai chức năng từ *Cloflexus aurantiacus*, nhưng ít có độ tương đồng về trình tự. Cả hai enzyme malonyl-CoA reductaza tiềm năng này có độ tương đồng trình tự cao so với aspartat-semialdehyt dehydrogenaza, enzym xúc tác quá trình khử và khử phosphoryl hóa đồng thời aspartyl-4-phosphat thành aspartat semialdehyt. Gen bổ sung tiềm năng có thể được tìm thấy từ trình tự tương đồng với các protein trong các vi sinh vật khác bao gồm *Sulfolobus solfataricus* và *Sulfolobus axitocaldarius*.

Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*
mcr	NP_378167.1	*Sulfolobus tokodaii*
asd-2	NP_343563.1	*Sulfolobus solfataricus*
Saci_2370	YP_256941.1	*Sulfolobus axitocaldarius*

1.2.1.c-Oxidoreductaza (khử carboxyl, khử 2-oxo axit thành axyl-CoA)

Các enzym thuộc nhóm này bao gồm 1) 2-keto-axit mạch nhánh dehydrogenaza, 2) alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và 3) phức hệ đa enzym pyruvat dehydrogenaza (PDHC). Các enzym này là các phức hệ đa enzym xúc tác chuỗi phản ứng dẫn đến axyl hóa, oxi hóa, khử carboxyl các 2-keto-axit. Mỗi phức hệ 2-keto-axit dehydrogenaza giữ các vị trí quan trọng trong quá trình chuyển hóa trung gian và hoạt tính enzym thường được điều hòa một cách chặt chẽ (Fries et al. *Biochemistry* 42:6996-7002 (2003)). Các enzym này sử dụng chung một phức hệ nhưng cấu trúc thông thường bao gồm nhiều bản

sao của ba thành phần xúc tác: alpha-ketoaxit decarboxylaza (E1), dihydrolipoamit axyltransferaza (E2) và dihydrolipoamit dehydrogenaza (E3). Thành phần E3 được sử dụng chung cho tất cả các phức hệ 2-keto-axit dehydrogenaza ở vi sinh vật, trong khi đó các thành phần E1 và E2 được mã hóa bởi các gen khác nhau. Các thành phần enzym này có mặt ở một số bản sao trong phức hệ và sử dụng nhiều đồng nhân tố để xúc tác chuỗi phản ứng có định hướng thông qua hệ thống kênh cơ chất. Kích thước tổng thể của các phức hệ này là rất lớn, với khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 4 đến 10 triệu Da (có nghĩa là lớn hơn kích thước của ribosom).

Hoạt tính của các enzym thuộc họ 2-keto-axit dehydrogenaza thông thường thấp hoặc bị hạn chế dưới các điều kiện kỵ khí ở *E. coli*. Tăng sinh tổng hợp NADH (hoặc NADPH) có thể dẫn đến trạng thái mất cân bằng oxi hóa khử và bản thân NADH đóng vai trò là chất ức chế đối với hoạt tính enzym. Engineering efforts đã làm tăng hoạt tính trong điều kiện kỵ khí của phức hệ pyruvat dehydrogenaza ở *E. coli* (Kim et al. *Appl.Environ.Microbiol.* 73:1766-1771 (2007); Kim et al. *J.Bacteriol.* 190:3851-3858) 2008); Zhou et al. *Biotechnol.Lett.* 30:335-342 (2008)). Ví dụ, tác dụng ức chế của NADH có thể được khắc phục bằng cách thiết kế đột biến H322Y ở thành phần E3 (Kim et al. *J.Bacteriol.* 190:3851-3858 (2008)). Các nghiên cứu cấu trúc của từng thành phần và cách thức tác động lẫn nhau giữa các thành phần này trong phức hệ provide insight into các cơ chế xúc tác và cấu trúc của các enzym thuộc họ này (Aevarsson et al. *Nat.Struct.Biol.* 6:785-792 (1999); Zhou et al. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:14802-14807 (2001)). Cơ chất đặc hiệu của phức hệ dehydrogenaza thay đổi trong các vi sinh vật khác nhau, nhưng nhìn chung keto-axit mạch nhánh dehydrogenaza có phạm vi cơ chất rộng nhất.

Alpha-ketoglutarat dehydrogenaza (AKGD) biến đổi alpha-ketoglutarat thành suxinyl-CoA và là vị trí chủ yếu trong quá trình kiểm soát chuyển hóa thông qua chu trình TCA(Hansford, R. G. *Curr.Top.Bioenerg.* 10:217-278 (1980)). Được mã hóa bởi gens *sucA*, *sucB* và *Lpd* ở *E. coli*, quá trình biểu hiện gen mã hóa alpha-ketoglutarat dehydrogenaza AKGD được điều hòa xuôi chiều dưới các điều kiện kỵ khí và trong thời gian sinh trưởng trên glucoza (Park et al.mol.*Microbiol.* 15:473-482 (1995)). Mặc dù phạm vi cơ chất của alpha-ketoglutarat dehydrogenaza hẹp, các nghiên cứu cấu trúc của tâm xúc tác của thành phần E2 xác định các gốc đặc hiệu quyết định tính đặc hiệu cơ chất (Knapp et al. *J.Mol.Biol.* 280:655-668 (1998)). *Bacillus subtilis* AKGD, được mã hóa bởi

odhAB (E1 và E2) và *pdhD* (E3, vùng được phân chia), được điều hòa ở mức độ phiên mã và phụ thuộc vào nguồn cacbon và pha sinh trưởng của vi sinh vật (Resnekov et al.mol.*Gen.Gent.* 234:285-296 (1992)). Ở nấm men, gen *LPD1* mã hóa thành phần E3 được điều hòa ở mức độ phiên mã bởi glucoza (Roy và Dawes *J.Gen.Microbiol.* 133:925-933 (1987)). Thành phần E1, được mã hóa bởi *KGD1*, cũng được điều hòa bởi glucoza và được hoạt hóa bởi sản phẩm của HAP2 và HAP3 (Repetto and Tzagoloffmol.*Cell Biol.* 9:2695-2705 (1989)). Phức hệ enzym alpha-ketoglutarat dehydrogenaza, bị ức chế bởi các sản phẩm NADH và suxinyl-CoA, đã được nghiên cứu kỹ lưỡng ở các hệ động vật có vú, do chức năng suy giảm liên quan đến một số bệnh thần kinh (Tretter and Dam-Vizi *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 360:2335-2345 (2005)).

sucA	NP_415254.1	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
sucB	NP_415255.1	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
lpd	NP_414658.1	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
odhA	P231292	*Bacillus subtilis*
odhB	P16263.1	*Bacillus subtilis*
pdhD	P21880.1	*Bacillus subtilis*
KGD1	NP_012141.1	*Saccharomyces cerevisiae*
KGD2	NP_010432.1	*Saccharomyces cerevisiae*
LPD1	NP_116635.1	*Saccharomyces cerevisiae*

Phức hệ 2-keto-axit dehydrogenaza mạch nhánh (BCKAD), cũng được biết đến là 2-oxoisovalerat dehydrogenaza, tham gia vào các quá trình phân hủy axit amin mạch nhánh, biến đổi các dẫn xuất 2-keto axit của valin, leuxin và isoleuxin thành các dẫn xuất axyl-CoA của chúng và CO_2. Phức hệ này đã được nghiên cứu ở nhiều vi sinh vật bao gồm *Bacillus subtilis* (Wang et al. *Eur.J.Biochem.* 213:1091-1099 (1993)), *Rattus norvegicus* (Namba et al. *J.Biol.Chem.* 244:4437-4447 (1969)) và *Pseudomonas putida* (Sokatch *J.Bacteriol.* 148:647-652 (1981)). Ở *Bacillus subtilis* enzym này được mã hóa bởi các gen *pdhD* (thành phần E3), *bfmBB* (thành phần E2), *bfmBAA* và *bfmBAB* (thành phần E1) (Wang et al. *Eur.J.Biochem.* 213:1091-1099 (1993)). Ở các động vật có vú, phức hệ này được điều hòa bởi quá trình phosphoryl hóa do các phosphataza và protein kinaza đặc hiệu. Phức hệ này đã được nghiên cứu ở các tế bào gan chuột (Chicco et al. *J.Biol.Chem.* 269:19427-19434 (1994)) và được mã hóa bởi các gen *Bckdha* (E1 alpha), *Bckdhb* (E1 beta), *Dbt* (E2) và *Dld* (E3). Các thành phần E1 và E3 của phức hệ 2-keto-axit dehydrogenaza mạch nhánh của *Pseudomonas putida* đã được kết tinh (Aevarsson et al.

Nat.Struct.Biol. 6:785-792 (1999); Mattevi *Science* 255:1,544-1550 (1992)) và phức hệ enzym này đã được nghiên cứu (Sokatch et al. *J.Bacteriol.* 148:647-652 (1981)). Quá trình phiên mã của các gen mã hóa phức hệ 2-keto-axit dehydrogenaza mạch nhánh của *P. putida* được hoạt hóa bởi sản phẩm gen của *bkdR* (Heste et al. *Eur.J.Biochem.* 233:828-836 (1995)). Ở một số vi sinh vật bao gồm *Rattus norvegicus* (Paxton et al. *Biochem.J.* 234:295-303 (1986)) và *Saccharomyces cerevisiae* (Sinclair et al. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 31:911-922 (1993)), ngoài các tiền chất của axit amin mạch nhánh, phức hệ này đã được chứng minh là có khả năng phản ứng với nhiều cơ chất bao gồm các oxo-axit mạch thẳng như 2-oxobutanoat và alpha-ketoglutarat. Vị trí hoạt động của phức hệ 2-keto-axit dehydrogenaza mạch nhánh ở bò được thiết kế để ưu tiên thay thế cơ chất axetyl-CoA (Meng and Chuang, *Biochemistry* 33:12879-12885 (1994)).

bfmBB	NP_390283.1	*Bacillus subtilis*
bfmBAA	NP_390285.1	*Bacillus subtilis*
bfmBAB	NP_390284.1	*Bacillus subtilis*
pdhD	P21880.1	*Bacillus subtilis*
lpdV	P09063.1	*Pseudomonas putida*
bkdB	P09062.1	*Pseudomonas putida*
bkdA1	NP_746515.1	*Pseudomonas putida*
bkdA2	NP_746516.1	*Pseudomonas putida*
Bckdha	NP_036914.1	*Rattus norvegicus*
Bckdhb	NP_062140.1	*Rattus norvegicus*
Dbt	NP_445764.1	*Rattus norvegicus*
Dld	NP_955417.1	*Rattus norvegicus*

Phức hệ pyruvat dehydrogenaza, xúc tác quá trình biến đổi pyruvat thành axetyl-CoA, cũng đã được nghiên cứu đầy đủ. Ở enzym của *E. coli,* các gốc đặc hiệu ở thành phần E1 quyết định tính đặc hiệu cơ chất (Bisswanger, H. *J Biol Chem.* 256:815-822 (1981); Bremer, J. *Eur.J Biochem.* 8:535-540 (1969); Gong et al. *J Biol Chem.* 275:13645-136,53 (2000)). Như được đề cập trước đó, quá trình thiết kế enzyme đã nỗ lực cải thiện hoạt tính enzym pyruvat dehydrogenaza của *E. coli* dưới các điều kiện kỵ khí (Kim et al. *Appl.Environ.Microbiol.* 73:1766-1771 (2007); Kim *J.Bacteriol.* 190:3851-3858 (2008); Zhou et al. *Biotechnol.Lett.* 30:335-342 (2008)). Ngược lại với phức hệ pyruvat dehydrogenaza của *E. coli*, phức hệ này của *B. subtilis* là enzym hoạt động và cần thiết cho quá trình sinh trưởng dưới các điều kiện kỵ khí (Nakano *J.Bacteriol.* 179:6749-675,5 (1997)). Phức hệ pyruvat dehydrogenaza của *Klebsiella pneumoniae*, được mô tả đặc tính trong quá trình sinh trưởng trên glyxerol, cũng là enzym hoạt động dưới các điều kiện kỵ

khí (Menzel et al. *J.Biotechnol.* 56:135-142 (1997)). Các cấu trúc tinh thể của phức hệ enzym này từ thận bò (Zhou et al. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:14802-14807 (2001)) và vùng xúc tác E2 từ *Azotobacter vinelandii* là sẵn có (Mattevi et al. *Science* 255:1,544-1550 (1992)). Một số phức hệ enzym pyruvat dehydrogenaza ở động vật có vú có thể phản ứng với các cơ chất thay thế như 2-oxobutanoat, thông qua việc so sánh quá trình động học của phức hệ enzym pyruvat dehydrogenaza và 2-keto-axit dehydrogenaza mạch nhánh cho thấy rằng phức hệ enzym 2-keto-axit dehydrogenaza mạch nhánh có hoạt tính cao hơn đối với các cơ chất 2-oxobutanoat (Paxton et al. *Biochem.J.* 234:295-303 (1986)).

aceE	NP_414656.1	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
aceF	NP_414657.1	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
lpd	NP_414658.1	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
pdhA	P21881.1	*Bacillus subtilis*
pdhB	P21882.1	*Bacillus subtilis*
pdhC	P21883.2	*Bacillus subtilis*
pdhD	P21880.1	*Bacillus subtilis*
aceE	YP_001333808.1	*Klebsiella pneumonia MGH78,578*
aceF	YP_001333809.1	*Klebsiella pneumonia MGH78,578*
lpdA	YP_001333810.1	*Klebsiella pneumonia MGH78,578*
Pdha1	NP_0010040722	*Rattus norvegicus*
Pdha2	NP_446446.1	*Rattus norvegicus*
Dlat	NP_112287.1	*Rattus norvegicus*
Dld	NP_955417.1	*Rattus norvegicus*

Để thay thế cho các phức hệ 2-keto-axit dehydrogenaza đa enzym mạch lớn được mô tả nêu trên, một số vi sinh vật kỵ khí sử dụng các enzym thuộc họ 2-ketoaxit oxidoreductaza (OFOR) để xúc tác axyl hóa, oxi hóa, khử carboxy hóa các 2-keto-axit. Không giống như phức hệ dehydrogenaza, các enzym này chứa các nhóm chức sắt-lưu huỳnh, sử dụng các đồng nhân tố khác nhau và sử dụng feredoxin hoặc flavodixin làm các chất nhận điện tử thay cho NAD(P)H. Mặc dù hầu hết các enzym thuộc họ này là đặc hiệu với cơ chất pyruvat (POR) một số 2-keto-axit:feredoxin oxidoreductaza đã được chứng minh là có khả năng tiếp nhận nhiều cơ chất 2-ketoaxit bao gồm alpha-ketoglutarat và 2-oxobutanoat (Fukuda and Wakagi *Biochim.Biophys.Acta* 1597:74-80 (2002); Zhang et al. *J.Biochem.* 120:587-599 (1996)). Một enzym thuộc nhóm này là 2-ketoaxit oxidoreductaza (OFOR) từ cổ khuẩn ưa nhiệt và axit *Sulfolobus tokodaii 7*, enzym này chứa tiểu đơn vị alpha và bêta được mã hóa bởi gen *ST2300* (Fukuda and Wakagi *Biochim.Biophys.Acta* 1597:74-80 (2002); Zhang et al. *J.Biochem.* 120:587-599 (1996)).

Hệ biểu hiện có thành phần chính là plasmit đã được phát triển để biểu hiện hiệu quả protein này ở *E. coli* (Fukuda et al. *Eur.J.Biochem.* 268:5639-5646 (2001)) và các gốc tham gia vào tính đặc hiệu cơ chất đã được xác định (Fukuda and Wakagi *Biochim.Biophys.Acta* 1597:74-80 (2002)). Hiện nay, hai enzym 2-ketoaxit oxidoreductaza (OFOR) từ *Aeropyrum pernix str. K1* cũng đã được tách dòng vào *E. coli*, đã được mô tả đặc tính và phát hiện là có khả năng phản ứng với nhiều cơ chất 2-oxoaxit (Nishizawa et al. *FEBS Lett.* 579:2319-2322 (2005)). Trình tự gen mã hóa các enzym 2-ketoaxit oxidoreductaza (OFOR) tiềm năng này là sẵn có, mặc dù cho đến nay các gen này chưa được đăng ký trên GenBank. Có bằng chứng về dữ liệu tin sinh học cho thấy rằng các enzym tương tự là có mặt trong tất cả các cổ khuẩn, một số vi khuẩn kỵ khí sinh vật nhân thật phân bào trực phân có ty thể (Fukuda and Wakagi *Biochim.Biophys.Acta* 1597:74-80 (2005)). Nhóm enzym này cũng được quan tâm từ quan điểm năng lượng, khi feredoxin dạng khử có thể được sử dụng để tạo ra NADH bởi feredoxin-NAD reductaza (Petitdemange et al. *Biochim.Biophys.Acta* 421:334-337 (1976)). Ngoài ra, do hầu hết các enzym được thiết kế để có thể hoạt động dưới các điều kiện kỵ khí, nên không nhiều thiết kế enzym có thể cần thiết cho các enzyme thuộc họ phức hệ 2-keto-axit dehydrogenaza đối với hoạt tính trong môi trường kỵ khí.

ST2300	NP_378302.1	*Sulfolobus tokodaii 7*

1.2.1.d-Oxidoreductaza (phosphoryl hóa/khử phosphoryl hóa)

Ví dụ về các enzym thuộc nhóm này bao gồm glyxeraldehyt 3-phosphat dehydrogenaza biến đổi glyxeraldehyt-3-phosphat thành D-glyxerat 1,3-bisphosphat (ví dụ, gen *gapA* của *E. coli* (Branlant and Branlant *Eur.J.Biochem.* 150:61-66(1985)), aspartat-semialdehyt dehydrogenaza biến đổi L-Aspartat-4-semialdehyt thành L-4-aspartyl-phosphat (ví dụ, *E. coli asd* (Biellmann et al. *Eur.J.Biochem.* 104:53-58 (1980)), N-axetyl-gama-glutamyl-phosphat reductaza biến đổi N-axetyl-L-glutamat-5-semialdehyt thành N-axetyl-L-glutamyl-5-phosphat (ví dụ, *E. coli argC* (Parsot et al. Gen 68:275-283 (1988)) và glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza biến đổi L-glutamat-5-semialdehyt thành L-glutamyl-5-phosphat (ví dụ, *E. coli proA* (Smith et al. *J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984)).

gapA	P0A9B22	*Escherichia coli*
asd	NP_417891.1	*Escherichia coli*
argC	NP_418393.1	*Escherichia coli*
proA	NP_414778.1	*Escherichia coli*

1.3.1.a-Oxidoreductaza tác động trên chất cho CH-CH

Ví dụ về enoyl-CoA reductaza là sản phẩm gen của *bcd* từ *C. acetobutylicum* (Atsumi et al. *Metab Eng* (2007); Boynton et al. *Journal of Bacteriology* 178:3015-3024 (1996), xúc tác một cách tự nhiên quá trình khử crotonyl-CoA thành butyryl-CoA. Hoạt tính của enzym này có thể được cải thiện bằng cách biểu hiện gen *bcd* tiếp hợp với quá trình biểu hiện các gen *etfAB* của *C. acetobutylicum etfAB*, mã hóa flavoprotein chuyển điện tử. Ngoài ra, enzym enoyl-CoA reductaza tiềm năng là enoyl-CoA reductaza ty thể từ *E. gracilis* (Hoffmeister et al. *Journal of Biological Chemistry* 280:4329-4338 (2005)). Cấu trúc thu được từ trình tự này sau khi loại bỏ trình tự chỉ huy mục tiêu ty thể của nó được tách dòng vào *E. coli* tạo ra enzym có hoạt tính (Hoffmeister et al., supra, (2005)). Phương pháp tiếp cận này đã được biến đến rộng rãi bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này về quá trình biểu hiện các gen của sinh vật nhân thật, cụ thể là quá trình biểu hiện của các trình tự chỉ huy mà có thể hướng mục tiêu sản phẩm gen đến khoang nội bào đặc hiệu, ở các sinh vật tiền nhân. Gen tương đồng chặt chẽ với gen này, TDE0597, từ vi sinh vật tiền nhân *Treponema denticola* thể hiện enoyl-CoA reductaza thứ ba đã được tách dòng và biểu hiện ở *E. coli* (TucclI và Martin *FEBS Letters* 581:1561-1566 (2007)).

bcd	NP_349317.1	*Clostridium acetobutylicum*
etfA	NP_349315.1	*Clostridium acetobutylicum*
etfB	NP_349316.1	*Clostridium acetobutylicum*
TER	Q5EU90.1	*Euglena gracilis*
TDE0597	NP_971211.1	*Treponema denticola*

Ví dụ về các enzym 2-enoat reductaza (EC 1.3.1.31) được biết đến để xúc tác quá trình khử phụ thuộc NADH nhiều α, β-axit carboxylic không no và aldehut khác nhau (Rohdich et al. *J.Biol.Chem.* 276:5779-5787 (2001)). Enzym 2-enoat reductaza được mã hóa bởi *enr* ở một số loài *Clostridia* (Giesel and Simon *Arch Microbiol.* 135(1): p. 51-57 (2001) bao gồm *C. tyrobutyricum* và *C. thermoaxeticum* (hiện nay có danh pháp khoa học là *Moorella thermoaxeticum*) (Rohdich et al., supra, (2001)). Trong trình tự bộ gen được công bố gần đây của *C. kluyveri*, 9 trình tự mã hóa cho các enzym enoat reductaza đã được báo cáo ghi nhận và một trong số đó đã được mô tả đặc tính (Seedorf et al. *Proc Natl Acad*

Sci U. S. A. 105(6):2128-33 (2008)). Các gen *enr* từ cả hai loài *C. tyrobutyricum* và *C. thermoaxeticum* đã được tách dòng và giải trình tự và có 59% độ tương đồng với nhau. Gen trước đây cũng được tìm thấy có khoảng 75% độ tương đồng với gen đặc trưng ở loài *C. kluyveri* (Giesel and Simon *Arch Microbiol* 135(1):51-57 (1983)). Cũng được báo cáo ghi nhận rằng trên cơ sở các trình tự này cho thấy gen *enr* rất tương đồng với dienoyl CoA reductaza ở *E. coli* (*fadH*) (163 Rohdich et al., supra (2001)). Gen *enr* của *C. thermoaxeticum* cũng đã được biểu hiện dưới dạng có hoạt tính enzym ở *E. coli* (163 Rohdich et al., supra (2001)).

fadH	NP_417552.1	*Escherichia coli*
enr	ACA54153.1	*Clostridium botulinum A3 str*
enr	CAA71086.1	*Clostridium tyrobutyricum*
enr	CAA76083.1	*Clostridium kluyveri*
enr	YP_430895.1	*Moorella thermoaxetica*

1.4.1.a-Oxidoreductaza tác động lên các axit amin

Hầu hết các oxidoreductaza tác động lên các axit amin xúc tác quá trình oxi hóa khử amin các alpha axit amin với NAD+ hoặc NADP+ là chất nhận điện tử. Ví dụ về các oxidoreductaza tác động lên các axit amin bao gồm glutamat dehydrogenaza (khử amin), được mã hóa bởi gen *gdhA*, leuxin dehydrogenaza (khử amin), được mã hóa bởi gen *ldh* và aspartat dehydrogenaza (khử amin), được mã hóa bởi gen *nadX*. Sản phẩm gen *gdhA* từ *Escherichia coli* (Korber et al. *J.Mol.Biol.* 234:1270-1273 (1993); McPherson and Wootton *Nucleic.Axits Res.* 11:5257-5266 (1983)), *gdh* từ *Thermotoga maritima* (Kort et al. *Extremophiles* 1:52-60 (1997); Lebbink, et al. *J.Mol.Biol.* 280:287-296 (1998)); Lebbink et al. *J.Mol.Biol.* 289:357-369 (1999)) và *gdhA1* từ *Halobacterium salinarum* (Ingoldsby et al. *Gen* 349:237-244 (2005)) xúc tác quá trình hỗ biến thuận nghịch glutamat thành 2-oxoglutarat và amoniac, tương ứng, ưu tiên NADP(H), NAD(H) hoặc cả hai làm chất nhận điện tử. Gen *ldh* của *Bacillus cereus* mã hóa LeuDH protein có dải cơ chất rộng bao gồm leuxin, isoleuxin, valin và 2-aminobutanoat (Ansorge and Kula *Biotechnol Bioeng.* 68:557-562 (2000); Stoyan et al. *J.Biotechnol* 54:77-80 (1997)). Gen *nadX* từ *Thermotoga maritime* mã hóa cho aspartat dehydrogenaza tham gia vào quá trình sản sinh NAD (Yang et al. *J.Biol.Chem.* 278:8804-8808 (2003)).

gdhA	P00370	*Escherichia coli*
gdh	P961104	*Thermotoga maritima*
gdhA1	NP_279651.1	*Halobacterium salinarum*
ldh	P0A393	*Bacillus cereus*
nadX	NP_229443.1	*Thermotoga maritima*

Lysin 6-dehydrogenaza (khử amin), được mã hóa bởi *lysDH* gen, xúc tác quá trình oxi hóa khử nhóm ε-amino của L-lysin để tạo thành 2-aminoadipat-6-semialdehyt, tham gia vào các chu trình không enzym để tạo thành Δ1-piperidein-6-carboxylat (Misono and Nagasaki *J.Bacteriol.* 150:398-401 (1982)). Gen *lysDH* từ *Geobacillus stearothermophilus* mã hóa cho lysin 6-dehydrogenaza phụ thuộc NAD ưa nhiệt (Heydari et al. *Appl Environ.Microbiol* 70:937-942 (2004)). Ngoài ra, gen *lysDH* từ *Aeropyrum pernix K1* được xác định thông qua độ tương đồng từ các công trình nghiên cứu bộ gen.

lysDH	AB052732	*Geobacillus stearothermophilus*
lysDH	NP_147035.1	*Aeropyrum pernix K1*
ldh	P0A393	*Bacillus cereus*

2.3.1.a-Axyltransferaza (chuyển nhóm phosphat)

Ví dụ về các enzym axyltransferaza chuyển phosphat bao gồm phosphotransaxetylaza, được mã hóa bởi gen *pta* và phosphotransbutyrylaza, được mã hóa bởi gen *ptb*. Gen *pta* từ *E. coli* mã hóa cho enzym có thể biến đổi axetyl-CoA thành axetyl-phosphat và ngược lại (Suzuki, T. *Biochim.Biophys.Acta* 191:5,59-569 (1969)). Enzym này cũng có thể sử dụng propionyl-CoA thay vì axetyl-CoA tạo thành propionat trong quá trình này (Hesslinger et al.mol.*Microbiol* 27:477-492 (1998)). Tương tự, gen *ptb* từ *C. acetobutylicum* mã hóa cho enzym có thể biến đổi butyryl-CoA thành butyryl-phosphat (Walter et al. *Gen* 134(1): p. 107-11 (1993)); Huang et al. *Jmol Microbiol Biotechnol* 2(1): p. 33-38 (2000). Ngoài ra, các gen *ptb* có thể được tìm thấy ở chủng sinh tổng hợp butyrat L2-50 (Louis et al. *J.Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004)) và *Bacillus megaterium* (Vazquez et al. *Curr.Microbiol* 42:345-349 (2001)).

pta	NP_416800.1	*Escherichia coli*
ptb	NP_349676	*Clostridium acetobutylicum*
ptb	AAR19757.1	butyrat-producing bacterium L2-50
ptb	CAC07932.1	*Bacillus megaterium*

2.6.1.a-Aminotransferaza

Aspartat aminotransferaza chuyển nhóm amino từ phân tử aspartat sang phân tử alpha-ketoglutarat, tạo thành glutamat và oxaloaxetat. Quá trình biến đổi này được xúc tác, ví dụ, bởi các sản phẩm gen của *aspC* từ *Escherichia coli* (Yagi et al. *FEBS Lett.* 100:81-84 (1979); Yagi et al. *Methods Enzymol.* 113:83-89 (1985)), gen *AAT2* từ *Saccharomyces cerevisiae* (Yagi et al. *J Biochem.* 92:35-43 (1982)) và gen *ASP5* từ *Arabidopsis thaliana* (48, 108, 225 48, de la et al. *Plant J* 46:414-42,5 (2006); Kwok and Hanson *J Exp.Bot.* 55:595-604 (2004); Wilkie and Warren *Protein Expr.Purif.* 12:381-389 (1998)). Valin aminotransferaza xúc tác quá trình biến đổi valin và pyruvat thành 2-ketoisovalerat và alanin. Gen *avtA* của *E. coli* mã hóa cho một enzym loại này (Whalen and Berg *J.Bacteriol.* 150:739-746 (1982)). Sản phẩm gen này cũng xúc tác quá trình amin hóa alpha-ketobutyrat để tạo thành alpha-aminobutyrat, mặc dù chất nhận nhóm amin tham gia vào phản ứng này chưa được xác định (Whalen and Berg *J.Bacteriol.* 158:571-574 (1984)). Sản phẩm gen của *E. coli serC* xúc tác hai phản ứng, phosphoserin aminotransferaza và phosphohydroxythreonin aminotransferaza (Lam and Winkler *J.Bacteriol.* 172:6,518-6528 (1990)) và hoạt tính đối với các cơ chất không được phosphoryl hóa không thể phát hiện được (Drewke et al. *FEBS.Lett.* 390:179-182 (1996)).

aspC	NP_415448.1	*Escherichia coli*
AAT2	P235423	*Saccharomyces cerevisiae*
ASP5	P462482	*Arabidopsis thaliana*
avtA	YP_026231.1	*Escherichia coli*
serC	NP_415427.1	*Escherichia coli*

Cargill đã phát triển beta-alanin/alpha-ketoglutarat aminotransferaza để sinh tổng hợp axit 3-hydroxybutanoic beta-alanin thông qua malonyl-semialdehyt (PCT/US2007/076252 (Jessen et al)). Sản phẩm gen của SkPYD4 từ *Saccharomyces kluyveri* cũng cho thấy ưu tiên sử dụng beta-alanin làm chất cho nhóm amino (Andersen et al. *FEBS.J.* 274:1804-1817 (2007)). Gen SkUGA1 mã hóa cho enzym tương đồng của *Saccharomyces cerevisiae* GABA aminotransferaza, UGA1 (Ramos et al. *Eur.J.Biochem.* 149:401-404 (1985)), trong khi đó gen SkPYD4 mã hóa cho enzym tham gia vào cả quá trình chuyển amin hóa beta-alanin và GABA (Andersen et al. *FEBS.J.* 274:1804-1817 (2007)). Enzym 3-Amino-2-metylpropionat transaminaza xúc tác quá trình biến đổi từ metylmalonat semialdehyt thành 3-amino-2-metylpropionat. Enzym đã được mô tả đặc

tính ở *Rattus norvegicus* and *Sus scrofa* và được mã hóa bởi gen *Abat* (Kakimoto et al. *Biochim.Biophys.Acta* 156:374-380 (1968); Tamaki et al. *Methods Enzymol.* 324:376-389 (2000)). Enzym tiềm năng trong các vi sinh vật khác có độ tương đồng về trình tự cao với 3-amino-2-metylpropionat transaminaza bao gồm *Gta-1* ở *C. elegans* và *gabT* ở *Bacillus subtilus*. Ngoài ra, một trong số các GABA aminotransferaza ở *E. coli*, được mã hóa bởi gen *gabT*, đã được chứng minh là có tính đặc hiệu cơ chất rộng (Liu et al. *Biochemistry* 43:10896-1090,5 (2004); Schulz et al. *Appl Environ Microbiol* 56:1-6 (1990)). Sản phẩm gen của *puuE* xúc tác enzym 4-aminobutyrat transaminaza khác ở *E. coli* (Kurihara et al. *J.Biol.Chem.* 280:4602-4608 (2005).).

SkyPYD4	ABF58893.1	*Saccharomyces kluyveri*
SkUGA1	ABF58894.1	*Saccharomyces kluyveri*
UGA1	NP_011533.1	*Saccharomyces cerevisiae*
Abat	P50554.3	*Rattus norvegicus*
Abat	P801472	*Sus scrofa*
Gta-1	Q21217.1	*Caenorhabditis elegans*
gabT	P94427.1	*Bacillus subtilus*
gabT	P22256.1	*Escherichia coli K12*
puuE	NP_415818.1	*Escherichia coli K12*

Cấu trúc tinh thể tia X của 4-aminobutyrat transaminaza ở *E. coli* không liên kết và liên kết với chất ức chế đã được ghi nhận (Liu et al. *Biochemistry* 43:10896-1090,5 (2004)). Tính đặc hiệu và gắn kết với cơ chất đã được nghiên cứu và đề xuất. Vai trò của các gốc thuộc vị trí hoạt động đã được nghiên cứu bằng quá trình gây đột biến điểm định hướng và phương pháp tinh thể học tia X (Liu et al. *Biochemistry* 44:2982-2992 (2005)). Dựa trên thông tin về cấu trúc, các nỗ lực đã được thực hiện để thiết kế 4-aminobutyrat transaminaza của *E. coli* có hoạt tính enzym mới. Các nghiên cứu này đề xuất nguyên lý làm tăng hoạt tính transaminaza cho quá trình sản sinh BDO.

2.7.2.a-Phosphotransferaza, chất nhận nhóm carboxyl

Ví dụ về các kinaza bao gồm axetat kinaza của *E. coli*, được mã hóa bởi gen *ackA* (Skarstedt and Silverstein *J.Biol.Chem.* 251:6775-6783 (1976)), butyrat kinaza của *C. acetobutylicum*, được mã hóa bởi gen *buk1* và *buk2* (Walter et al. *Gen* 134(1):107-111 (1993) (Huang et al. *Jmol Microbiol Biotechnol* 2(1):33-38 (2000)] và gama-glutamyl kinaza của *E. coli*, được mã hóa bởi gen *proB* (Smith et al. *J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984)). Các enzyme này tương ứng phosphoryl hóa axetat, butyrat và glutamat. Sản phẩm gen *ackA* từ *E. coli* cũng phosphoryl hóa propionat (Hesslinger et al.mol.*Microbiol* 27:477-492 (1998)).

ackA	NP_416799.1	*Escherichia coli*
buk1	NP_349675	*Clostridium acetobutylicum*
buk2	Q97II1	*Clostridium acetobutylicum*
proB	NP_414777.1	*Escherichia coli*

2.8.3.a-Coenzym-A transferaza

Trong họ enzym CoA-transferaza, enzym axyl-CoA:axetat-CoA transferaza của *E. coli*, cũng được biết đến là axetat-CoA transferaza (EC 2.8.3.8), đã được chứng minh là có khả năng biến đổi gốc CoA thành axetat từ nhiều cơ chất axyl-CoA mạch thẳng và mạch nhánh, bao gồm isobutyrat (Matthies and Schink *Appl Environ Microbiol* 58:1435-1439 (1992)), valerat (Vanderwinkel et al. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 33:902-908 (1968)) và butanoat (Vanderwinkel, supra (1968)). Enzym này được mã hóa bởi gen *atoA* (tiểu đơn vị alpha) và gen *atoD* (tiểu đơn vị beta) ở *E. coli* sp. K12 (Korolev et al. *Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.*58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel, supra (1968)) và gen *actA* và *cg0592* ở *Corynebacterium glutamicum ATCC 13032* (Duncan et al. *Appl Environ Microbiol* 68:5186-5190 (2002)). Các enzym bổ sung này được tìm thấy từ độ tương đồng về trình tự bao gồm gen *atoD* và *atoA* ở *Escherichia coli UT189,*

atoA	P76459.1	*Escherichia coli K12*
atoD	P76458.1	*Escherichia coli K12*
actA	YP_226809.1	*Corynebacterium glutamicum ATCC13032*
cg0592	YP_224801.1	*Corynebacterium glutamicum ATCC13032*
atoA	ABE07971.1	*Escherichia coli UT189*
atoD	ABE07970.1	*Escherichia coli UT189*

Các quá trình biến đổi tương tự được xúc tác bởi các sản phẩm gen *cat1*, *cat2* và *cat3* của *Clostridium kluyveri* đã được chứng minh là thể hiện tương ứng hoạt tính suxinyl-CoA, 4-hydroxybutyryl-CoA và butyryl-CoA axetyltransferaza (Seedorf et al. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 105(6):2128-2133 (2008); Sohling and Gottschalk *J Bacteriol* 178(3):871-880 (1996)].

cat1	P38946.1	*Clostridium kluyveri*
cat2	P38942.2	*Clostridium kluyveri*
cat3	EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*

Enzym glutaconat-CoA-transferaza (EC 2.8.3.12) từ vi khuẩn kỵ khí *Axitaminococcus fermentans* phản ứng với diaxit glutaconyl-CoA và 3-butenoyl-CoA (Mack and Buckel *FEBS Lett.* 405:209-212 (1997)). Các gen mã hóa enzym này là *gctA* và *gctB*. Enzym này đã khử nhưng hoạt tính có thể phát hiện đối với với các dẫn xuất CoA khác bao gồm glutaryl-CoA, 2-hydroxyglutaryl-CoA, adipyl-CoA và acrylyl-CoA (Buckel et al. *Eur.J.Biochem.* 118:315-321 (1981)). Enzym này đã được tách dòng và biểu hiện ở *E. coli* (Mac et al. *Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)).

gctA	CAA57199.1	*Axitaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200.1	*Axitaminococcus fermentans*

3.1.2.a-Thioleste hydrolaza (đặc hiệu với CoA)

Trong họ enzym CoA hydrolaza, enzym 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolaza là đặc hiệu đối với 3-HIBCoA và đã được mô tả là để xúc tác hiệu quả biến đổi mong muốn trong quá trình phân hủy valin (Shimomura et al. *J Biol Chem* 269:14248-14253 (1994)). Các gen mã hóa cho enzym này bao gồm *hibch* của *Rattus norvegicus* (Shimomura et al., supra (1994); Shimomura et al. *Methods Enzymol.* 324:229-240 (2000) và *Homo sapiens* (Shimomura et al., supra, 2000). Các gen tiềm năng được xác định từ độ tương đồng về trình tự bao gồm *hibch* của *Saccharomyces cerevisiae* và *BC_2292* của *Bacillus cereus*.

hibch	Q5XIE62	*Rattus norvegicus*
hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*
hibch	P288172	*Saccharomyces cerevisiae*
BC_2292	Q81DR3	*Bacillus cereus*

Quá trình biến đổi adipyl-CoA thành adipat có thể được thực hiện bởi axyl-CoA hydrolaza hoặc thioesteaza tương đương. Gen tiềm năng hàng đầu từ *E. coli* là *tesB*

(Naggert et al. *J Biol Chem.* 266(17):11044-11050 (1991)] thể hiện độ tương đồng cao với gen *acot8* ở người mà là enzym dicarboxylic axit axetyltransferaza có hoạt tính đối với adipyl-CoA (Westin et al. *J Biol Chem* 280(46): 38125-38132 (2005). Hoạt tính này cũng đã được mô tả đặc trưng ở gan chuột (Deana, *Biochem Int.* 26(4): p. 767-773 (1992)).

tesB	NP_414986	*Escherichia coli*
acot8	CAA15502	*Homo sapiens*
acot8	NP_570112	*Rattus norvegicus*

Nhóm enzym thioleste hydrolaza tiềm năng khác ở *E. coli* bao gồm các sản phẩm gen của *tesA* (Bonner and Bloch, *J Biol Chem.* 247(10):3123-3133 (1972)), *ybgC* (Kuznetsova et al., *FEMS Microbiol Rev.* 29(2):263-279 (2005); Zhuang et al., *FEBS Lett.* 516(1-3):161-163 (2002)) *paaI* (Song et al., *J Biol Chem.* 281(16):11028-11038 (2006)) và *ybdB* (Leduc et al., *J Bacteriol.* 189(19):7112-7126 (2007)).

tesA	NP_415027	*Escherichia coli*
ybgC	NP_415264	*Escherichia coli*
paaI	NP_415914	*Escherichia coli*
ybdB	NP_415129	*Escherichia coli*

Một số axetyl-CoA hydrolaza (EC 3.1.2.1) ở sinh vật nhân thật có tính đặc hiệu cơ chất rộng. Enzym từ não của *Rattus norvegicus* (Robinson et al. *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 71:959-965 (1976)) có thể phản ứng với butyryl-CoA, hexanoyl-CoA và malonyl-CoA.

acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*

4.1.1.a-Carboxy-lyaza

Ví dụ về carboxy-lyaza là axetolactat decarboxylaza tham gia vào quá trình chuyển hóa xitrat và sinh tổng hợp axit amin mạch nhánh, biến đổi 2-axetolactat thành axetoin. Trong enzym từ *Lactococcus lactis* bao gồm sáu tiểu đơn vị, được mã hóa bởi gen *aldB* và hoạt hóa bởi valin, leuxin và isoleuxin (Goupil et al. *Appl.Environ.Microbiol.* 62:2636-2640 (1996); Goupil-Feuillerat et al. *J.Bacteriol.* 182:5399-5408 (2000)). Enzym này đã được biểu hiện quá mức và mô tả cấu trúc ở *E. coli* (Phalip et al. *FEBS Lett.* 351:95-99 (1994)). Trong các vi sinh vật khác enzym này là dime, được mã hóa bởi gen *aldC* ở *Streptococcus thermophilus* (Monnet et al. *Lett.Appl.Microbiol.* 36:399-405 (2003)), gen

aldB ở Bacillus brevis (Diderichsen et al. *J.Bacteriol.* 172:4315-4321 (1990); Najmudin et al. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.*59:1073-1075 (2003)) và gen *budA* từ *Enterobacter aerogens* (Diderichsen et al. *J.Bacteriol.* 172:4315-4321 (1990)). Enzym này từ *Bacillus brevis* đã được tách dòng và biểu hiện quá mức ở *Bacillus subtilis* và được mô tả cấu trúc tinh thể (Najmudin et al. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 59:1073-1075 (2003)). Ngoài ra, enzym này từ *Leuconostoc lactis* đã được tinh chế và mô tả đặc tính nhưng gen mã hóa cho enzym này chưa được phân lập (O'Sullivan et al. *FEMS Microbiol.Lett.* 194:245-249 (2001)).

aldB	NP_267384.1	*Lactococcus lactis*
aldC	Q8L208	*Streptococcus thermophilus*
aldB	P23616.1	*Bacillus brevis*
budA	P05361.1	*Enterobacter aerogens*

Aconitat decarboxylaza xúc tác giai đoạn cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp itaconat ở chủng *Candida* và cũng ở chủng nấm sợi *Aspergillus terreus* (Bonnarme et al. *J Bacteriol.* 177:3573-3578 (1995); Willke and Vorlop *Appl Microbiol Biotechnol* 56:289-295 (2001)). Mặc dùng, itaconat là hợp chất quan trọng trong công nghệ sinh học nhưng cho đến nay gen mã hóa hoặc trình tự protein của aconitat decarboxylaza chưa được ghi nhận.

Enzym 4-oxalocronat decarboxylaza đã được phân lập từ một số vi sinh vật và mô tả cấu trúc. Các gen mã hóa cho enzym này bao gồm *dmpH* và D*mpE* ở *Pseudomonas sp. (chủng 600)* (Shingler et al. *J Bacteriol.* 174:711-724 (1992)), *xylII và xylIII từ Pseudomonas putida* (Kato and Asano *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997); Lian and Whitman *J.Am.Chem.Soc.* 116:10403-10411 (1994); Stanley et al. *Biochemistry* 39:3514 (2000)) và *Reut_B5691* và *Reut_B5692* từ *Ralstonia eutropha JMP134* (Hughes et al. *J Bacteriol.* 158:79-83 (1984)). Các gen mã hóa cho enzym này từ *Pseudomonas sp. (chủng 600)* đã được tách dòng và biểu hiện ở *E. coli* (Shingler et al. *J Bacteriol.* 174:711-724 (1992)).

dmpH	CAA43228.1	*Pseudomonas sp. CF600*
dmpE	CAA43225.1	*Pseudomonas sp. CF600*
xylII	YP_709328.1	*Pseudomonas putida*
xylII	YP_709353.1	*Pseudomonas putida*
Reut_B5691	YP_299880.1	*Ralstonia eutropha JMP134*
Reut_B5692	YP_299881.1	*Ralstonia eutropha JMP134*

Nhóm decarboxylaza bổ sung đã được mô tả đặc tính xúc tác quá trình biến đổi xinamat (phenylacrylat) và dẫn xuất xinamat được thế thành dẫn xuất styren tương ứng. Các enzym này là phổ biến ở nhiều vi sinh vật và các gen đặc hiệu mã hóa cho các enzym này đã được tách dòng và biểu hiện ở *E. coli* bao gồm: gen *pad1* từ *Saccharomyces cerevisae* (Clausen et al. *Gen* 142:107-112 (1994)), gen *pdc* từ *Lactobacillus plantarum* (Barthelmebs et al. *Appl Environ Microbiol* 67:1063-1069 (2001); Qi et al. *Metab Eng* 9:268-276 (2007); Rodriguez et al. *J.Agric.Food Chem.* 56:3068-3072 (2008)), gen *pofK* (*pad*) từ *Klebsiella oxytoca* (Hashidoko et al. *Biosci.Biotech.Biochem.* 58:217-218 (1994); Uchiyama et al. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 72:116-123 (2008)), *Pedicoccus pentosaceus* (Barthelmebs et al. *Appl Environ Microbiol* 67:1063-1069 (2001)) và gen *padC* từ *Bacillus subtilis* và *Bacillus pumilus* (Lingen et al. *Protein Eng* 15:585-593 (2002)). Ferulic axit decarboxylaza từ *Pseudomonas fluorescens* cũng đã được tinh chế và mô tả cấu trúc (Huang et al. *J.Bacteriol.* 176:5912-5918 (1994)). Quan trọng là, nhóm enzym này đã được chứng minh là ổn định và không yêu cầu đồng nhân tố ngoại sinh hoặc liên kết nội phân tử, do đó là các enzym lý tưởng thích hợp cho các quá trình biến nạp sinh học (Sariaslani, *Annu.Rev.Microbiol.* 61:51-69 (2007)).

pad1	AB368798	*Saccharomyces cerevisae*
pdc	U63827	*Lactobacillus plantarum*
pofK (pad)	AB330293	*Klebsiella oxytoca*
padC	AF017117	*Bacillus subtilis*
pad	AJ276891	*Pedicoccus pentosaceus*
pad	AJ278683	*Bacillus pumilus*

Các enzym decarboxylaza bổ sung này có thể tạo ra suxinic semialdehyt từ alpha-ketoglutarat. Chúng bao gồm enzym alpha-ketoglutarat decarboxylaza từ *Euglena gracilis* (Shigeoka et al. *Biochem.J.* 282(Pt 2):319-323 (1992); Shigeoka and Nakano *Arch.Biochem.Biophys.* 288:22-28 (1991); Shigeoka and Nakano *Biochem.J.* 292 (Pt 2):463-467 (1993)), trình tự gen tương ứng của enzym này vẫn chưa được xác định và

alpha-ketoglutarat decarboxylaza từ *Mycobacterium tuberculosis* (Tian et al. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102:10670-10675 (2005)). Ngoài ra, các enzym glutamat decarboxylaza có thể biến đổi glutamat thành 4-aminobutyrat như sản phẩm của các gen *gadA* và *gad*B của *E. coli* (De Biase et al. *Protein.Expr.Purif.* 8:430-438 (1993)).

kgd	O50463.4	*Mycobacterium tuberculosis*
gadA	NP_417974	*Escherichia coli*
gadB	NP_416010	*Escherichia coli*

Keto-axit decarboxylaza

Pyruvat decarboxylaza (PDC, EC 4.1.1.1), cũng được biết đến là keto-axit decarboxylaza, là enzym quan trọng trong quá trình lên men rượu, xúc tác phản ứng khử carboxyl pyruvat thành axetaldehyt. Enzym này có khả năng phản ứng với nhiều cơ chất axit béo 2-keto bao gồm 2-ketobutyrat, 2-ketovalerat, 3-hydroxypyruvat và 2-phenylpyruvat (Berg et al. *Science* 318:1782-1786 (2007)). Pyruvat decarboxylaza từ *Zymomonas mobilus*, được mã hóa bởi gen *pdc*, là đối tượng của các nghiên cứu thiết kế có định hướng để làm biến đổi ái lực đối với các cơ chất khác nhau (Siegert et al. *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)). Pyruvat decarboxylaza từ *Saccharomyces cerevisiae* cũng đã được nghiên cứu đầy đủ, thiết kế để làm biến đổi hoạt tính và được biểu hiện chức năng ở *E. coli* (Killenberg-Jabs et al. *Eur.J.Biochem.* 268:1698-1704 (2001); LI and Jordan *Biochemistry* 38:10004-10012 (1999); ter Schure et al. *Appl.Environ.Microbiol.* 64:1303-1307 (1998)). Cấu trúc tinh thể của enzym này là sẵn có (Killenberg-Jabs *Eur.J.Biochem.* 268:1698-1704 (2001)). Các enzym pyruvat decarboxylaza đặc trưng tiềm năng khác bao gồm các enzym từ *Acetobacter pasteurians* (Chandra et al. *Arch.Microbiol.* 176:443-451 (2001)) và *Kluyveromyces lactis* (Krieger et al. *Eur.J.Biochem.* 269:3256-3263 (2002)).

Gen	Số đăng ký GenBank	Vi sinh vật
pdc	P06672.1	*Zymomonas mobilus*
pdc1	P06169	*Saccharomyces cerevisiae*
pdc	Q8L388	*Acetobacter pasteurians*
pdc1	Q12629	*Kluyveromyces lactis*

Tương tự enzym pyruvat decarboxylaza, benzoylformat decarboxylaza (EC 4.1.1.7) có khả năng phản ứng với nhiều cơ chất và được xem là mục tiêu của các nghiên cứu thiết kế enzym. Enzym benzoylformat decarboxylaza từ *Pseudomonas putida* đã được nghiên cứu sâu rộng và các cấu trúc tinh thể của enzym này là sẵn có (Hasson et al. *Biochemistry* 37:9918-9930 (1998); Polovnikova et al. *Biochemistry* 42:1820-1830 (2003)). Quá trình gây đột biến điểm định hướng của hai gốc ở vị trí hoạt động của enzym benzoylformat decarboxylaza từ *Pseudomonas putida* đã làm biến đổi ái lực (Km) đối với các cơ chất có và không có trong tự nhiên (Siegert *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)). Các đặc tính của enzym này đã tiếp tục được biến đổi bằng quá trình thiết kế có định hướng (Lingen et al. *Protein Eng* 15:585-593 (2002)); Lingen *Chembiochem* 4:721-726 (2003)). Enzym benzoylformat decarboxylaza từ *Pseudomonas aeruginosa*, được mã hóa bởi gen *mdlC*, cũng đã được mô tả đặc tính bằng thực nghiệm (Barrowman et al. *FEMS Microbiology Letters* 34:57-60 (1986)). Gen bổ sung tiềm năng từ *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* và các vi sinh vật khác có thể được suy luận từ độ tương đồng trình tự hoặc xác định bằng cách sử dụng hệ thống chọn lọc sinh trưởng được phát triển ở *Pseudomonas putida* (Henning et al. *Appl.Environ.Microbiol.* 72:7510-7517 (2006)).

mdlC	P209062	*Pseudomonas putida*
mdlC	Q9HUR2.1	*Pseudomonas aeruginosa*
dpgB	ABN80423.1	*Pseudomonas stutzeri*
ilvB-1	YP_260581.1	*Pseudomonas fluorescens*

4.2.1.a-Hydro-lyaza

Ví dụ về hydro-lyaza là enzym 2-(hydroxymetyl)glutarat dehydrataza của *Eubacterium barkeri*. Enzym này đã được nghiên cứu trong phạm vi quá trình dị hóa nicotinat và được mã hóa bởi gen *hmd* (Alhapel et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12341-12346 (2006)). Các enzym tương tự có độ tương đồng trình tự cao đã được tìm thấy ở *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus colihominis* và *Natranaerobius thermophilius*.

hmd	ABC88407.1	*Eubacterium barkeri*
BACCAP_02294	ZP_02036683.1	*Bacteroides capillosus* ATCC 29799
ANACOL_02527	ZP_02443222.1	*Anaerotruncus colihominis* DSM 17241
NtherDRAFT_2368	ZP_02852366.1	*Natranaerobius thermophilus* JW/NM-WN-LF

Ví dụ thứ hai về hydro-lyaza là fumarat hydrataza, enzym xúc tác quá trình khử nước malat thành fumarat. Rất giàu thông tin về cấu trúc sẵn có đối với enzym này và các nhà nghiên cứu đã phát hiện ra enzym được thiết kế thành công để biến đổi hoạt tính, ức chế và xác định vị trí (Weaver, T. *Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.* 61:1395-1401 (2005)). Các fumarat hydrataza bổ sung bao gồm các enzym được mã hóa bởi gen *fumC* từ *Escherichia coli* (Estevez et al. *Protein Sci.* 11:1552-1557 (2002); Hong và Lee *Biotechnol.Bioprocess Eng.* 9:252-255 (2004); Rose and Weaver *Proc Natl Acad Sci U S.A* 101:3393-3397 (2004)), *Campylobacter jejuni* (Smith et al. *Int.J Biochem.Cell Biol* 31:961-975 (1999)) và *Thermus thermophilus* (Mizobata et al. *Arch.Biochem.Biophys.* 355:49-55 (1998)) và gen *fumH* từ *Rattus norvegicus* (Kobayashi et al. *J Biochem.* 89:1923-1931(1981)). Các enzym tương tự có độ tương đồng trình tự cao bao gồm gen *fum1* từ *Arabidopsis thaliana* và *fumC* từ *Corynebacterium glutamicum*.

fumC	P05042.1	*Escherichia coli K12*
fumC	O69294.1	*Campylobacter jejuni*
fumC	P84127	*Thermus thermophilus*
fumH	P14408.1	*Rattus norvegicus*
fum1	P93033.2	*Arabidopsis thaliana*
fumC	Q8NRN8.1	*Corynebacterium glutamicum*

Citramalat hydrolyaza, cũng được biết đến là 2-metylmalat dehydrataza, biến đổi 2-metylmalat thành mesaconat. Hoạt tính 2-metylmalat dehydrataza đã được phát hiện ở *Clostridium tetanomorphum*, *Morganella morganii*, *Citrobacter amalonaticus* trong phạm vi quá trình VI phân hủy glutamat (Kato and Asano *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997)); tuy nhiên cho đến nay các gen mã hóa enzym này chưa được giải trình tự.

Sản phẩm gen của *crt* từ *C. acetobutylicum* xúc tác quá trình khử nước 3-hydroxybutyryl-CoA thành crotonyl-CoA (Atsumi et al. *Metab Eng.*; 29 (2007)); Boynton et al. *Journal of Bacteriology* 178:3015-3024 (1996)). Các enzym enoyl-CoA hydrataza, poly-hydroxyalkanoat *A* and poly-hydroxyalkanoat B, của *P. putida* được tin là để thực hiện hydroxyl hóa các liên kết đôi trong quá trình dị hóa phenylaxetat; (Olivera et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11):6419-6424 (1998)). Gen *paaA* và *paaB* từ *P. fluorescens* xúc tác các quá trình biến đổi tương tự (14 Olivera et al., supra, 1998). Cuối cùng, một số gen của *Escherichia* đã được chứng minh chức năng enoyl-CoA hydrataza bao gồm gen *maoC* (Park và Lee *J Bacteriol* 185(18):5391-5397 (2003)), *paaF* (Park và Lee *Biotechnol*

Bioeng. 86(6):681-686 (2004a)); Park và Lee *Appl Biochem Biotechnol.* 113-116: 335-346 (2004b)); Ismail et al. *Eur J Biochem* 270(14):p. 3047-3054 (2003) và *paaG* (Park và Lee, supra, 2004; Park và Lee supra, 2004b; Ismail et al., supra, 2003).

maoC	NP_415905.1	*Escherichia coli*
paaF	NP_415911.1	*Escherichia coli*
paaG	NP_415912.1	*Escherichia coli*
crt	NP_349318.1	*Clostridium acetobutylicum*
paaA	NP_745427.1	*Pseudomonas putida*
paaB	NP_745426.1	*Pseudomonas putida*
phaA	ABF82233.1	*Pseudomonas fluorescens*
phaB	ABF82234.1	*Pseudomonas fluorescens*

Các gen *fadA* và *fadB* của *E. coli* mã hóa phức hệ đa enzym thể hiện hoạt tính ketoaxyl-CoA thiolaza, 3-hydroxyaxyl-CoA dehydrogenaza và enoyl-CoA hydrataza (Yang et al. *Biochemistry* 30(27): p. 6788-6795 (1991); Yang et al. *J Biol Chem* 265(18): p. 10424-10429 (1990); Yang et al. *J Biol Chem* 266(24): p. 16255 (1991); NakahigashI và Inokuchi *Nucleic Axits Res* 18(16): p. 4937 (1990)). Các gen *fadI và fadJ* mã hóa các chức năng tương tự và chỉ được biểu hiện kỵ khí một cách tự nhiên (Campbell et al.mol *Microbiol* 47(3): p. 793-805 (2003). Phương pháp để sinh tổng hợp poly[(R)-3-hydroxybutyrat] ở *E. coli* bao gồm quá trình hoạt hóa *fadB* (bằng cách phân tách yếu tố điều hòa âm tính, *fadR*) và đồng biểu hiện ketothiolaza không có nguồn gốc tự nhiên (*phaA* từ *Ralstonia eutropha*) đã được mô tả trước đó (Sato et al. *J Biosci Bioeng* 103(1): 38-44 (2007)). Hoạt động này rõ ràng chứng minh rằng quá trình beta-oxi hóa enzym, cụ thể là sản phẩm gen của *fadB* mã hóa cho cả hoạt tính của 3-hydroxyaxyl-CoA dehydrogenaza và enoyl-CoA hydrataza, có thể thực hiện chức năng như một phần của quá trình để sinh tổng hợp các phân tử mạch dài từ các tiền chất axetyl-CoA.

fadA	YP_026272.1	*Escherichia coli*
fadB	NP_418288.1	*Escherichia coli*
fadI	NP_416844.1	*Escherichia coli*
fadJ	NP_416843.1	*Escherichia coli*
fadR	NP_415705.1	*Escherichia coli*

4.3.1.a-Amoniac-lyaza

Aspartaza (EC 4.3.1.1), xúc tác quá trình khử amin aspartat thành fumarat, là enzym phổ rộng ở các vi sinh vật và đã được mô tả đặc tính rộng rãi (Viola, R. E.

Adv.Enzymol.Relat Areasmol.Biol 74:295-341 (2000)). Cấu trúc tinh thể của aspartaza ở *E. coli* được mã hóa bởi gen *aspA*, đã được giải quyết (Shi et al. *Biochemistry* 36:9136-9144 (1997)). Enzym này ở *E. coli* enzym cũng đã được chứng minh để phản ứng với các cơ chất thay thế aspartatphenylmetyleste, asparagin, benzyl-aspartat và malat (Ma et al. *Ann N.Y.Acad Sci* 672:60-65 (1992)). Trong nghiên cứu riêng biệt khác, quá trình tiến hóa có định hướng đã được sử dụng đối với enzym này để làm biến đổi tính đặc hiệu với cơ chất (Asano et al. *Biomol.Eng* 22:95-101 (2005)). Các enzyms có hoạt tính aspartaza have cũng đã được mô tả đặc tính ở *Haemophilus influenzae* (Sjostrom et al. *Biochim.Biophys.Acta* 1324:182-190 (1997)), *Pseudomonas fluorescens* (Takagi et al. *J.Biochem.* 96:545-552 (1984)), *Bacillus subtilus* (Sjostrom et al. *Biochim.Biophys.Acta* 1324:182-190 (1997)) và *Serratia marcescens* (TakagI và Kisumi *J Bacteriol.* 161:1-6 (1985)).

aspA	NP_418562	*Escherichia coli K12 subsp. MG1655*
aspA	P44324.1	*Haemophilus influenzae*
aspA	P07346.1	*Pseudomonas fluorescens*
ansB	P26899.1	*Bacillus subtilus*
aspA	P33109.1	*Serratia marcescens*

Enzym 3-metylaspartaza (EC 4.3.1.2), cũng được biết đến là beta-metylaspartaza hoặc 3-metylaspartat amoniac-lyaza, xúc tác quá trình khử amin threo-3-metylasparatat thành mesaconat. Enzym 3-metylaspartaza từ *Clostridium tetanomorphum* đã được tách dòng, biểu hiện chức năng ở *E. coli* và kết tinh (Asuncion et al. *Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.* 57:731-733 (2001); Asuncion et al. *J Biol Chem.* 277:8306-8311 (2002); Botting et al. *Biochemistry* 27:2953-2955 (1988); Goda et al. *Biochemistry* 31:10747-10756 (1992). Ở *Citrobacter amalonaticus*, enzym này được mã hóa bởi *BAA28709* (Kato and Asano *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997)). Enzym 3-metylaspartaza cũng đã được kết tinh từ *E. coli YG1002* (Asano and Kato *FEMS Microbiol Lett.* 118:255-258 (1994)) mặc dù trình tự protein của enzym này chưa được công bố trên các cơ sở dữ liệu công cộng như GenBank. Độ tương đồng về trình tự có thể được sử dụng để xác định các gen tiềm năng bổ sung, bao gồm *CTC_02563* ở *C. tetanI* và *ECs0761* ở *Escherichia coli O157:H7*.

MAL	AAB24070.1	*Clostridium tetanomorphum*
BAA28709	BAA28709.1	*Citrobacter amalonaticus*
CTC_02563	NP_783085.1	*Clostridium tetani*
ECs0761	BAB34184.1	*Escherichia coli O157:H7 str. Sakai*

Enzym amoniac-lyaza tạo thành các sản phẩm enoyl-CoA bao gồm beta-alanyl-CoA amoniac-lyaza (EC 4.3.1.6), khử amin beta-alanyl-CoA và 3-aminobutyryl-CoA amoniac-lyaza (EC 4.3.1.14). Hai beta-alanyl-CoA amoniac lyaza đã được xác định và mô tả cấu trúc ở *Clostridium propionicum* (Herrmann et al. *FEBS J.* 272:813-821 (2005)). Cho đến này không có beta-alanyl-CoA amoniac lyaza nào khác đã được nghiên cứu, nhưng gen tiềm năng có thể được xác định từ độ tương đồng trình tự. Một gen tiềm năng này là MXAN_4385 ở *Myxococcus xanthus*.

acl2	CAG29275.1	*Clostridium propionicum*
acl1	CAG29274.1	*Clostridium propionicum*
MXAN_4385	YP_632558.1	*Myxococcus xanthus*

5.3.3.a-Isomeraza

Các enzym 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza từ cả *Clostridium aminobutyrium* và *C. kluyveri* xúc tác quá trình biến đổi thuận nghịch 4-hydroxybutyryl-CoA thành crotonyl-CoA và có hoạt tính vinylaxetyl-CoA Δ-isomeraza nội tại (Scherf and Buckel *Eur.J Biochem.* 215:421-429 (1993); Scherf et al. *Arch.Microbiol* 161:239-245 (1994)). Cả hai enzym có nguồn gốc tự nhiên này đã được tinh chế và mô tả cấu trúc, bao gồm các trình tự axit amin kết thúc bằng đầu tận cùng N (Scherf and Buckel, supra, 1993; Scherf et al., supra, 1994). Các gen *abfD* từ *C. aminobutyrium* và *C. kluyveri* phù hợp chính xác với các trình tự axit amin kết thúc bằng đầu tận cùng N này, và là 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratazas/vinylaxetyl-CoA Δ-isomeraza được mã hóa. Ngoài ra, gen *abfD* từ *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277* được xác định thông qua độ tương đồng từ các công trình nghiên cứu bộ gen.

abfD	YP_001396399.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*
abfD	P55792	*Clostridium aminobutyricum*
abfD	YP_001928843	*Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*

5.4.3.a-Aminomutaza

Ví dụ về aminomutaza là lysin 2,3-aminomutaza (EC 5.4.3.2) biến đổi lysin thành (3S)-3,6-diaminohexanoat, chuyển vị nhóm amin từ vị trí số 2 sang vị trí số 3. Enzym này được tìm thấy ở chủng lên men lysin thành axetat và butyrat, bao gồm như *Fusobacterium nuleatum* (*kamA*) (Barker et al. *J.Bacteriol.* 152:201-207 (1982)) và *Clostridium subterminale* (*kamA*) (Chirpich et al. *J.Biol.Chem.* 245:1778-1789 (1970)). Enzym từ *Clostridium subterminale* đã được kết tinh (Lepore et al. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:13819-13824 (2005)). Enzym mã hóa chức năng này cũng được mã hóa bởi gen *yodO* ở *Bacillus subtilus* (Chen et al. *Biochem.J.* 348 Pt 3:539-549 (2000)). Enzym này sử dụng pyridoxal 5'-phosphat làm đồng nhân tố, đòi hỏi quá trình hoạt hóa bởi S-Adenosylmetionin và chọn lọc đồng phân đối ảnh, chỉ phản ứng với L-lysin. Enzym chưa được chứng minh là để phản ứng với các cơ chất thay thế.

yodO	O346761	*Bacillus subtilus*
kamA	Q9XBQ81	*Clostridium subterminale*
kamA	Q8RHX4	*Fusobacterium nuleatum subsp. nuleatum*

Enzym aminomutaza thứ hai, beta-lysin 5,6-aminomutaza (EC 5.4.3.3), xúc tác giai đoạn tiếp theo của quá trình lên men lysin thành axetat và butyrat, biến đổi (3S)-3,6-diaminohexanoat thành (3S,5S)-35-diaminohexanoat, chuyển vị nhóm amin tận cùng từ vị trí số 6 sang vị trí số 5. Enzym này cũng xúc tác quá trình biến đổi lysin thành 2,5-diaminohexanoat và cũng được biết đến là lysin-5,6-aminomutaza (EC 5.4.3.4). Enzym này đã được kết tinh ở *Clostridium sticklandii* (*kamD, kamE*) (Berkovitch et al. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:15870-15875 (2004)). Enzym beta-lysin 5,6-aminomutaza từ *Porphyromonas gingivalis* cũng đã được mô tả đặc tính (Tang et al. *Biochemistry* 41:8767-8776 (2002)).

kamD	AAC79717.1	*Clostridium sticklandii*
kamE	AAC79718.1	*Clostridium sticklandii*
kamD	NC_0029502	*Porphyromonas gingivalis W83*
kamE	NC_0029502	*Porphyromonas gingivalis W83*

Enzym Ornithin 4,5-aminomutaza (EC 5.4.3.5) biến đổi D-Ornithin thành 2,4-diaminopentanoat, cũng chuyển vị nhóm amin tận cùng đến nguyên tử cacbon liền kề. Enzym 4,5-aminomutaza từ *Clostridium sticklandii* được mã hóa bởi hai gen, *oraE* và

oraS và đã được tách dòng, giải trình tự và biểu hiện ở *E. coli* (Chen et al. *J.Biol.Chem.* 276:44744-447,50 (2001)). Cho đến nay enzym này chưa được mô tả đặc tính ở các vi sinh vật khác.

oraE	AAK72502	*Clostridium sticklandii*
oraS	AAK72501	*Clostridium sticklandii*

Tyroxin 2,3-aminomutaza (EC 5.4.3.6) tham gia vào quá trình sinh tổng hợp tyroxin, biến đổi thuận nghịch tyroxin thành 3-amino-3-(4-hdyroxyphenyl)propanoat bằng cách chuyển vị nhóm amin từ vị trị số 2 sang vị trí số 3. Ở *Streptomyces globisporus* enzym này cũng được chứng minh là phản ứng với các dẫn xuất tyroxin (Christenson et al. *Biochemistry* 42:12708-12718 (2003)). Thông tin về trình tự của enzym này là không sẵn có.

Leuxin 2,3-aminomutaza (EC 5.4.3.7) biến đổi L-leuxin thành beta-leuxin trong quá trình sinh tổng hợp và phân hủy leuxin. Thử nghiệm đối với leuxin 2,3-aminomutaza đã phát hiện được hoạt tính ở nhiều vi sinh vật (Poston, J. M. *Methods Enzymol.* 166:130-135 (1988)) nhưng cho đến này các gen mã hóa cho enzym này vẫn chưa được xác định danh pháp.

Cargill đã phát triển enzym 2,3-aminomutaza mới để biến đổi L-alanin thành β-alanin, do đó tạo ra quá trình biến đổi từ pyruvat thành axit 3-hydroxyproprionic theo bốn giai đoạn sinh hóa (Liao et al., Công bố đơn của Mỹ số No. 2005-0221466).

6.2.1.a-Axit-thiol ligaza

Ví dụ về axit-thiol ligaza là các sản phẩm gen của *sucCD* của *E. coli* xúc tác quá trình hình thành suxinyl-CoA từ suxinat cùng với việc tiêu thụ một ATP, phản ứng này là thuận nghịch trong điều kiện *in vivo* (Buck et al. *Biochemistry* 24(22): p. 6245-6252 (1985)). Ví dụ bổ sung về các CoA-ligaza bao gồm dicarboxylat-CoA ligaza ở chuột trong đó trình tự của enzym này vẫn chưa được mô tả đặc tính (Vamecq et al. *Biochem J.* 230(3): p. 683-693 (1985)), một trong hai phenylaxetat-CoA ligaza được mô tả đặc tính từ *P. chrysogenum* (Lamas-Maceiras et al. *Biochem J* 395(1):147-155 (2006); Wang et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 360(2):453-458 (2007)), phenylaxetat-CoA ligaza từ *Pseudomonas putida* (Martinez-Blanco et al. *J Biol Chem.* 265(12):7084-7090 (1990)) và

6-carboxyhexanoat-CoA ligaza từ *Bacillus subtilis* (Bower et al. *J Bacteriol* 178(14):4122-4130 (1996)).

sucC	NP_415256.1	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	*Escherichia coli*
phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*
phlB	ABS19624.1	*Penicillium chrysogenum*
paaF	AAC24333.2	*Pseudomonas putida*
bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*

Ví dụ 5

Ví dụ về quá trình sản sinh BDO từ Suxinyl-CoA

Ví dụ này mô tả ví dụ về các quá trình sản sinh BDO từ suxinyl-CoA.

Quá trình sản sinh BDO từ suxinyl-CoA được mô tả trong sáng chế và đã được mô tả trước đây (tham khảo đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/049,2,56, nộp ngày 14 tháng 03 năm 2008 và đơn PCT số US08/,57168, nộp ngày 14 tháng 03 năm 2008, mỗi tài liệu này được kết hợp trong sáng chế để tham khảo). Các quá trình bổ sung được thể hiện trên Fig.8A. Các enzym tham gia vào các quá trình sản sinh BDO này được liệt kê trong bảng 15, cùng với các gen tương ứng mã hóa các enzym này.

Nói tóm lại, suxinyl-CoA có thể được biến đổi thành suxinic semialdehyt by suxinyl-CoA reductaza (hoặc suxinat semialdehyt dehydrogenaza) (EC 1.2.1.b). Suxinat semialdehyt có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyrat bởi 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza (EC 1.1.1.a), như được mô tả trước đó. Ngoài ra, suxinyl-CoA có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyrat by suxinyl-CoA reductaza (tạo thành rượu) (EC 1.1.1.c). 4-Hydroxybutyrat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-CoA bởi 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza (EC 2.8.3.a), như được mô tả trước đó, hoặc bởi 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza (EC 3.1.2.a) hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza (hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA syntetaza) (EC 6.2.1.a). Ngoài ra, 4-hydroxybutyrat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-phosphat bởi 4-hydroxybutyrat kinaza (EC 2.7.2.a), như được mô tả trước đó. 4-Hydroxybutyryl-phosphat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-CoA by phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza (EC 2.3.1.a), như được mô tả trước đó. Ngoài ra, 4-hydroxybutyryl-phosphat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi 4-hydroxybutanal dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (EC 1.2.1.d). 4-Hydroxybutyryl-CoA có

thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza) (EC 1.2.1.b). Ngoài ra, 4-hydroxybutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) (EC 1.1.1.c). 4-Hydroxybutanal có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 1,4-butandiol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a), như được mô tả trước đó.

Bảng 15. Quá trình sản sinh BDO từ suxinyl-CoA.

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
8A	1.2.1.b	suxinyl-CoA	suxinic semialdehyt	suxinyl-CoA reductaza (hoặc suxinat semialdehyt dehydrogenaza)	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	suxinyl-CoA
					sucD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	suxinyl-CoA
					Msed_0709	YP_00119080 8.1	*Metallosphaera sedula*	malonyl-CoA
8A	1.1.1.a	suxinat semialdehyt	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyrat dehydrogenaza	*4hbd*	YP_726053.1	*Ralstonia eutropha H16*	4-hydroxybutyrat
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	4-hydroxybutyrat
					4hbd	Q94B07	*Arabidopsis thaliana*	4-hydroxybutyrat
8A	1.1.1.c	suxinyl-CoA	4-hydroxybutyrat	suxinyl-CoA reductaza (tạo thành rượu)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoyl-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Cloflexus aurantiacus*	malonyl-CoA

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	axyl-CoA mạch dài
8A	2.8.3.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA transferaza	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	suxinat, 4-hydroxybutyrat, butyrat
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Axitaminococcus fermentans*	glutarat
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoat
8A	3.1.2.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipyl-CoA
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butyryl-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hydroxypropanoyl-CoA
8A	6.2.1.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA ligaza (hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA syntetaza)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	suxinat
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	phenylaxetat

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxyhexanoat
8A	2.7.2.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-phosphat	4-hydroxybutyrat kinaza	*ackA*	NP_416799.1	*Escherichia coli*	axetat, propionat
					buk1	NP_349675	*Clostridium acetobutylicum*	butyrat
					buk2	Q97II1	*Clostridium acetobutylicum*	butyrat
8A	2.3.1.a	4-hydroxybutyryl-phosphat	4-hydroxybutyryl-CoA	phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza	*ptb*	NP_349676	*Clostridium acetobutylicum*	butyryl-phosphat
					ptb	AAR19757.1	*butyrat-producing bacterium L2-50*	butyryl-phosphat
					ptb	CAC07932.1	*Bacillus megaterium*	butyryl-phosphat
8A	1.2.1.d	4-hydroxybutyryl-phosphat	4-hydroxybutanal	4-hydroxybutanal dehydrogenaza (phosphoryl hóa)	*asd*	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartyl-phosphat
					proA	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamyl-5-phosphat
					gapA	P0A9B22	*Escherichia coli*	Glyxeraldehyt-3-phosphat

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
8A	1.2.1.b	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutanal	4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza)	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	suxinyl-CoA
					sucD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	suxinyl-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	malonyl-CoA
8A	1.1.1.c	4-hydroxybutyryl-CoA	1,4-butandiol	4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoyl-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Cloflexus aurantiacus*	malonyl-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	axyl-CoA mạch dài
8A	1.1.1.a	4-hydroxybutanal	1,4-butandiol	1,4-butandiol dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt

Ví dụ 6

Ví dụ bổ sung về các quá trình sản sinh BDO từ alpha-ketoglutarat

Ví dụ này mô tả ví dụ về các quá trình sản sinh BDO từ alpha-ketoglutarat.

Quá trình sản sinh BDO từ suxinyl-CoA được mô tả trong sáng chế và đã được mô tả trước đây (tham khảo đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/049,256, nộp ngày 14 tháng 03 năm 2008 và đơn PCT số US08/,57168, nộp ngày 14 tháng 03 năm 2008, mỗi tài liệu này được kết hợp trong sáng chế để tham khảo). Các quá trình bổ sung được thể hiện trên Fig.8B. Các enzym tham gia vào các quá trình sản sinh BDO này được liệt kê trong bảng 16, cùng với các gen tương ứng mã hóa các enzym này.

Nói tóm lại, alpha-ketoglutarat có thể được biến đổi thành suxinic semialdehyt bởi alpha-ketoglutarat decarboxylaza (EC 4.1.1.a), như được mô tả trước đó. Ngoài ra, alpha-ketoglutarat có thể được biến đổi thành glutamat bởi glutamat dehydrogenaza (EC 1.4.1.a). 4-Aminobutyrat có thể được biến đổi thành suxinic semialdehyt bởi 4-aminobutyrat oxidoreductaza (khử amin) (EC 1.4.1.a) hoặc 4-aminobutyrat transaminaza (EC 2.6.1.a). Glutamat có thể được biến đổi thành 4-aminobutyrat bởi glutamat decarboxylaza (EC 4.1.1.a). Suxinat semialdehyt có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyrat bởi 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza (EC 1.1.1.a), như được mô tả trước đó. 4-Hydroxybutyrat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-CoA bởi 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza (EC 2.8.3.a), như được mô tả trước đó, hoặc bởi 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza (EC 3.1.2.a) hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza (hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA syntetaza) (EC 6.2.1.a). 4-Hydroxybutyrat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-phosphat bởi 4-hydroxybutyrat kinaza (EC 2.7.2.a). 4-Hydroxybutyryl-phosphat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-CoA by phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza (EC 2.3.1.a), như được mô tả trước đó. Ngoài ra, 4-hydroxybutyryl-phosphat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi 4-hydroxybutanal dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (EC 1.2.1.d). 4-Hydroxybutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza) (EC 1.2.1.b), như được mô tả trước đó. 4-Hydroxybutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) (EC 1.1.1.c). 4-Hydroxybutanal có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 1,4-butandiol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a), như được mô tả trước đó.

Bảng 16. Quá trình sản sinh BDO từ alpha-ketoglutarat.

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
8B	4.1.1.a	alpha-ketoglutarat	suxinic semialdehyt	alpha-ketoglutarat decarboxylaza	*kgd*	O50463.4	*Mycobacterium tuberculosis*	alpha-ketoglutarat
					gadA	NP_417974	*Escherichia coli*	glutamat
					gadB	NP_416010	*Escherichia coli*	glutamat
8B	1.4.1.a	alpha-ketoglutarat	glutamat	glutamat dehydrogenaza	*gdhA*	P00370	*Escherichia coli*	glutamat
					gdh	P961104	*Thermotoga maritima*	glutamat
					gdhA1	NP_279651.1	*Halobacterium salinarum*	glutamat
8B	1.4.1.a	4-aminobutyrat	suxinic semialdehyt	4-aminobutyrat oxidoreductaza (khử amin)	*lysDH*	AB052732	*Geobacillus stearothermophilus*	lysin
					lysDH	NP_147035.1	*Aeropyrum pernix K1*	lysin
					ldh	P0A393	*Bacillus cereus*	leuxin, isoleuxin, valin, 2-aminobutanoat
8B	2.6.1.a	4-aminobutyrat	suxinic semialdehyt	4-aminobutyrat transaminaza	*gabT*	P22256.1	*Escherichia coli*	4-aminobutyrat
					puuE	NP_415818.1	*Escherichia coli*	4-aminobutyrat

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
					UGA1	NP_011533.1	*Saccharomyces cerevisiae*	4-aminobutyrat
8B	4.1.1.a	glutamat	4-aminobutyrat	glutamat decarboxylaza	*gadA*	NP_417974	*Escherichia coli*	glutamat
					gadB	NP_416010	*Escherichia coli*	glutamat
					kgd	O50463.4	*Mycobacterium tuberculosis*	alpha-ketoglutarat
8B	1.1.1.a	suxinat semialdehyt	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyrat dehydrogenaza	*4hbd*	YP_726053.1	*Ralstonia eutropha H16*	4-hydroxybutyrat
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	4-hydroxybutyrat
					4hbd	Q94B07	*Arabidopsis thaliana*	4-hydroxybutyrat
8B	2.8.3.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA transferaza	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	suxinat, 4-hydroxybutyrat, butyrat
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Axitaminococcus fermentans*	glutarat
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoat
8B	3.1.2.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipyl-CoA

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butyryl-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hydroxypropanoyl-CoA
8B	6.2.1.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA ligaza (hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA syntetaza)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	suxinat
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	phenylaxetat
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxyhexanoat
8B	2.7.2.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-phosphat	4-hydroxybutyrat kinaza	*ackA*	NP_416799.1	*Escherichia coli*	axetat, propionat
					buk1	NP_349675	*Clostridium acetobutylicum*	butyrat
					buk2	Q97II1	*Clostridium acetobutylicum*	butyrat
8B	2.3.1.a	4-hydroxybutyryl-phosphat	4-hydroxybutyryl-CoA	phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza	*ptb*	NP_349676	*Clostridium acetobutylicum*	butyryl-phosphat
					ptb	AAR19757.1	*butyrat-producing bacterium L2-50*	butyryl-phosphat

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
					ptb	CAC07932.1	*Bacillus megaterium*	butyryl-phosphat
8B	1.2.1.d	4-hydroxybutyryl-phosphat	4-hydroxybutanal	4-hydroxybutanal dehydrogenaza (phosphoryl hóa)	*asd*	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartyl-phosphat
					proA	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamyl-5-phosphat
					gapA	P0A9B22	*Escherichia coli*	Glyxeraldehyt-3-phosphat
8B	1.2.1.b	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutanal	4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza)	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	suxinyl-CoA
					sucD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	suxinyl-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	malonyl-CoA
8B	1.1.1.c	4-hydroxybutyryl-CoA	1,4-butandiol	4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoyl-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Cloflexus aurantiacus*	malonyl-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	axyl-CoA mạch dài
8B	1.1.1.a	4-hydroxybutanal	1,4-butandiol	1,4-butandiol dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt

Ví dụ 7

Quá trình sản sinh BDO từ 4-aminobutyrat.

Ví dụ này mô tả quá trình sản sinh BDO từ 4-aminobutyrat.

Fig.9A mô tả ví dụ về các quá trình sản sinh BDO trong đó 4-aminobutyrat được biến đổi thành 1,4-butandiol. Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO này được liệt kê trong bảng 17, cùng với các gen tương ứng mã hóa các enzym này.

Nói tóm lại, 4-aminobutyrat có thể được biến đổi thành 4-aminobutyryl-CoA bởi 4-aminobutyrat CoA transferaza (EC 2.8.3.a), 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza (EC 3.1.2.a) hoặc 4-aminobutyrat-CoA ligaza (hoặc 4-aminobutyryl-CoA syntetaza) (EC 6.2.1.a). 4-aminobutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 4-oxobutyryl-CoA bởi 4-aminobutyryl-CoA oxidoreductaza (khử amin) (EC 1.4.1.a) hoặc 4-aminobutyryl-CoA transaminaza (EC 2.6.1.a). 4-oxobutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-CoA bởi 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza (EC 1.1.1.a). 4-hydroxybutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) (EC 1.1.1.c). Ngoài ra, 4-hydroxybutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza) (EC 1.2.1.b). 4-hydroxybutanal có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 1,4-butandiol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a).

Bảng 17. Quá trình sản sinh BDO từ 4-aminobutyrat.

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
9A	2.8.3.a	4-aminobutyrat	4-aminobutyryl-CoA	4-aminobutyrat CoA transferaza	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	suxinat, 4-hydroxybutyrat, butyrat
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Axitaminococcus fermentans*	glutarat
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoat
9A	3.1.2.a	4-aminobutyrat	4-aminobutyryl-CoA	4-aminobutyryl-CoA hydrolaza	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipyl-CoA
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butyryl-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hydroxypropanoyl-CoA
9A	6.2.1.a	4-aminobutyrat	4-aminobutyryl-CoA	4-aminobutyrat-CoA ligaza (hoặc 4-aminobutyryl-CoA syntetaza)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	suxinat
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	phenylaxetat
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxyhexanoat
9A	1.4.1.a	4-aminobutyryl-CoA	4-oxobutyryl-CoA	4-aminobutyryl-CoA oxidoreductaza	*lysDH*	AB052732	*Geobacillus stearothermophilus*	lysin

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
				(khử amin)				
					lysDH	NP_147035.1	*Aeropyrum pernix K1*	lysin
					ldh	P0A393	*Bacillus cereus*	leuxin, isoleuxin, valin, 2-aminobutanoat
9A	2.6.1.a	4-aminobutyryl-CoA	4-oxobutyryl-CoA	4-aminobutyryl-CoA transaminaza	*gabT*	P22256.1	*Escherichia coli*	4-aminobutyrat
					abat	P50554.3	*Rattus norvegicus*	3-amino-2-metylpropionat
					SkyPYD4	ABF58893.1	*Saccharomyces kluyveri*	beta-alanin
9A	1.1.1.a	4-oxobutyryl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt
8	1.1.1.c	4-hydroxybutyryl-CoA	1,4-butandiol	4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoyl-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Cloflexus aurantiacus*	malonyl-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	axyl-CoA mạch dài

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
8	1.2.1.b	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutanal	4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza)	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Suxinyl-CoA
					sucD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	Suxinyl-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonyl-CoA
8	1.1.1.a	4-hydroxybutanal	1,4-butandiol	1,4-butandiol dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt

Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO khác biến đổi 4-aminobutyrat thành 1,4-butandiol được thể hiện trên Fig.9A. Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO này được liệt kê trong bảng 18, cùng với các gen tương ứng mã hóa các enzym này.

Nói tóm lại, 4-aminobutyrat có thể được biến đổi thành 4-aminobutyryl-CoA bởi 4-aminobutyrat CoA transferaza (EC 2.8.3.a), 4-aminobutyryl-CoA hydrolaza (EC 3.1.2.a) hoặc 4-aminobutyrat-CoA ligaza (hoặc 4-aminobutyryl-CoA syntetaza) (EC 6.2.1.a). 4-aminobutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 4-aminobutan-1-ol bởi 4-aminobutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) (EC 1.1.1.c). Ngoài ra, 4-aminobutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 4-aminobutanal bởi 4-aminobutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-aminobutanal dehydrogenaza) (EC 1.2.1.b) và 4-aminobutanal được biến đổi thành 4-aminobutan-1-ol bởi 4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a). 4-aminobutan-1-ol có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin) (EC 1.4.1.a) hoặc 4-aminobutan-1-ol transaminaza (EC 2.6.1.a). 4-hydroxybutanal có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 1,4-butandiol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a).

Bảng 18. Quá trình sản sinh BDO từ 4-aminobutyrat.

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
9A	2.8.3.a	4-aminobutyrat	4-aminobutyryl-CoA	4-aminobutyrat CoA transferaza	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	suxinat, 4-hydroxybutyrat, butyrat
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Axitaminococcus fermentans*	glutarat
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoat
9A	3.1.2.a	4-aminobutyrat	4-aminobutyryl-CoA	4-aminobutyryl-CoA hydrolaza	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipyl-CoA
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butyryl-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hydroxypropanoyl-CoA
9A	6.2.1.a	4-aminobutyrat	4-aminobutyryl-CoA	4-aminobutyrat-CoA ligaza (hoặc 4-aminobutyryl-CoA syntetaza)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	suxinat
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	phenylaxetat
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxyhexanoat

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
9A	1.1.1.c	4-aminobutyryl-CoA	4-aminobutan-1-ol	4-aminobutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoyl-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Cloflexus aurantiacus*	malonyl-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	axyl-CoA mạch dài
9A	1.2.1.b	4-aminobutyryl-CoA	4-aminobutanal	4-aminobutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-aminobutanal dehydrogenaza)	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Suxinyl-CoA
					sucD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	Suxinyl-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonyl-CoA
9A	1.1.1.a	4-aminobutanal	4-aminobutan-1-ol	4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt
9A	1.4.1.a	4-aminobutan-	4-hydroxybutan	4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử	*lysDH*	AB052732	*Geobacillus*	lysin

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
		1-ol	al	amin)			*stearothermophilus*	
					lysDH	NP_147035.1	*Aeropyrum pernix K1*	lysin
					ldh	P0A393	*Bacillus cereus*	leuxin, isoleuxin, valin, 2-aminobutanoat
9A	2.6.1.a	4-aminobutan-1-ol	4-hydroxybutanal	4-aminobutan-1-ol transaminaza	*gabT*	P22256.1	*Escherichia coli*	4-aminobutyrat
					abat	P50554.3	*Rattus norvegicus*	3-amino-2-metylpropionat
					SkyPYD4	ABF58893.1	*Saccharomyces kluyveri*	beta-alanin
9A	1.1.1.a	4-hydroxybutanal	1,4-butandiol	1,4-butandiol dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt

Fig.9B mô tả ví dụ về quá trình sản sinh BDO trong đó 4-aminobutyrat được biến đổi thành 1,4-butandiol. Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO này được liệt kê trong bảng 19, cùng với các gen tương ứng mã hóa các enzym này.

Nói tóm lại, 4-aminobutyrat có thể được biến đổi thành axit [(4-aminobutanolyl)oxy] phosphonic bởi 4-aminobutyrat kinaza (EC 2.7.2.a). axit [(4-aminobutanolyl)oxy] phosphonic có thể được biến đổi thành 4-aminobutanal bởi 4-aminobutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (EC 1.2.1.d). 4-aminobutanal có thể được biến đổi thành 4-aminobutan-1-ol bởi 4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a). 4-aminobutan-1-ol có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi 4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin) (EC 1.4.1.a) hoặc 4-aminobutan-1-ol transaminaza (EC 2.6.1.a). Ngoài ra, axit [(4-aminobutanolyl)oxy] phosphonic có thể được biến đổi thành axit [(4-oxobutanolyl)oxy] phosphonic bởi axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic oxidoreductaza (khử amin) (EC 1.4.1.a) or axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic transaminaza (EC 2.6.1.a). axit [(4-oxobutanolyl)oxy] phosphonic có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-phosphat bởi 4-hydroxybutyryl-phosphat dehydrogenaza (EC 1.1.1.a). 4-hydroxybutyryl-phosphat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi 4-hydroxybutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (EC 1.2.1.d). 4-hydroxybutanal có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 1,4-butandiol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a).

Bảng 19. Quá trình sản sinh BDO từ 4-aminobutyrat.

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
9B	2.7.2.a	4-aminobutyrat	axit [(4-aminobutanoyl)oxy] phosphonic	4-aminobutyrat kinaza	*ackA*	NP_416799.1	*Escherichia coli*	axetat, propionat
					buk1	NP_349675	*Clostridium acetobutylicum*	butyrat
					proB	NP_414777.1	*Escherichia coli*	glutamat
9B	1.2.1.d	axit [(4-aminobutanoyl)oxy] phosphonic	4-aminobutanal	4-aminobutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa)	*asd*	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartyl-phosphat
					proA	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamyl-5-phosphat
					gapA	P0A9B22	*Escherichia coli*	Glyxeraldehyt-3-phosphat
9B	1.1.1.a	4-aminobutanal	4-aminobutan-1-ol	4-aminobutan-1-ol dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
9B	1.4.1.a	4-aminobutan-1-ol	4-hydroxybutanal	4-aminobutan-1-ol oxidoreductaza (khử amin)	*lysDH*	AB052732	*Geobacillus stearothermophilus*	lysin
					lysDH	NP_147035.1	*Aeropyrum pernix K1*	lysin
					ldh	P0A393	*Bacillus cereus*	leuxin, isoleuxin, valin, 2-aminobutanoat
9B	2.6.1.a	4-aminobutan-1-ol	4-hydroxybutanal	4-aminobutan-1-ol transaminaza	*gabT*	P22256.1	*Escherichia coli*	4-aminobutyrat
					abat	P50554.3	*Rattus norvegicus*	3-amino-2-metylpropionat
					SkyPYD4	ABF58893.1	*Saccharomyces kluyveri*	beta-alanin
9B	1.4.1.a	axit [(4-aminobutanolyl)oxy] phosphonic	axit [(4-oxobutanolyl)oxy] phosphonic	axit [(4-aminobutanolyl)oxy]phosphonic oxidoreductaza (khử amin)	*lysDH*	AB052732	*Geobacillus stearothermophilus*	lysin
					lysDH	NP_147035.1	*Aeropyrum pernix K1*	lysin
					ldh	P0A393	*Bacillus cereus*	leuxin, isoleuxin, valin,

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
								2-aminobutanoat
9B	2.6.1.a	axit [(4-aminobutanoyl)oxy] phosphonic	axit [(4-oxobutanolyl)oxy] phosphonic	axit [(4-aminobutanoyl)oxy]phosphonic transaminaza	*gabT*	P22256.1	*Escherichia coli*	4-aminobutyrat
					SkyPYD4	ABF58893.1	*Saccharomyces kluyveri*	beta-alanin
					serC	NP_415427.1	*Escherichia coli*	phosphoserin, phosphohydroxythreonin
9B	1.1.1.a	axit [(4-oxobutanolyl)oxy] phosphonic	4-hydroxybutyryl-phosphat	4-hydroxybutyryl-phosphat dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt
9B	1.2.1.d	4-hydroxybutyryl-phosphat	4-hydroxybutanal	4-hydroxybutyraldehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa)	*asd*	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartyl-phosphat
					proA	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamyl-5-phosphat

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
					gapA	P0A9B22	*Escherichia coli*	Glyxeraldehyt-3-phosphat
9B	1.1.1.a	4-hydroxybutanal	1,4-butandiol	1,4-butandiol dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt

Fig.9C thể hiện quá trình sản sinh BDO từ axetoaxetat.

Ví dụ 8

Ví dụ về các quá trình sản sinh BDO từ alpha-ketoglutarat

Ví dụ này mô tả ví dụ về các quá trình sản sinh BDO từ alpha-ketoglutarat.

Fig.10 mô tả ví dụ về các quá trình sản sinh BDO trong đó alpha-ketoglutarat được biến đổi thành 1,4-butandiol. Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO này được liệt kê trong bảng 20, cùng với các gen tương ứng mã hóa các enzym này.

Nói tóm lại, alpha-ketoglutarat có thể được biến đổi thành alpha-ketoglutaryl-phosphat bởi alpha-ketoglutarat 5-kinaza (EC 2.7.2.a). Alpha-ketoglutaryl-phosphat có thể được biến đổi thành axit 2,5-dioxopentanoic bởi 2,5-dioxopentanoic semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (EC 1.2.1.d). Axit 2,5-dioxopentanoic có thể được biến đổi thành axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic bởi axit 2,5-dioxopentanoic reductaza (EC 1.1.1.a). Ngoài ra, alpha-ketoglutarat có thể được biến đổi thành alpha-ketoglutaryl-CoA bởi alpha-ketoglutarat CoA transferaza (EC 2.8.3.a), alpha-ketoglutaryl-CoA hydrolaza (EC 3.1.2.a) hoặc alpha-ketoglutaryl-CoA ligaza (hoặc alpha-ketoglutaryl-CoA syntetaza) (EC 6.2.1.a). Alpha-ketoglutaryl-CoA có thể được biến đổi thành axit 2,5-dioxopentanoic bởi alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza (hoặc axit 2,5-dioxopentanoic dehydrogenaza) (EC 1.2.1.b). Axit 2,5-dioxopentanoic có thể được biến đổi thành axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic bởi axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza. Ngoài ra, alpha-ketoglutaryl-CoA có thể được biến đổi thành axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic bởi alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) (EC 1.1.1.c). Axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza (EC 4.1.1.a). 4-hydroxybutanal có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 1,4-butandiol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a). Axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-CoA bởi axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl) (EC 1.2.1.c).

Bảng 20. Quá trình sản sinh BDO từ alpha-ketoglutarat.

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
10	2.7.2.a	alpha-ketoglutarat	alpha-ketoglutaryl-phosphat	alpha-ketoglutarat 5-kinaza	*ackA*	NP_416799.1	*Escherichia coli*	axetat, propionat
					buk1	NP_349675	*Clostridium acetobutylicum*	butyrat
					proB	NP_414777.1	*Escherichia coli*	glutamat
10	1.2.1.d	alpha-ketoglutaryl-phosphat	axit 2,5-dioxopentanoic	2,5-dioxopentanoic semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa)	*proA*	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamyl-5-phosphat
					asd	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartyl-phosphat
					gapA	P0A9B22	*Escherichia coli*	Glyxeraldehyt-3-phosphat
10	1.1.1.a	axit 2,5-dioxopentanoic	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic	axit 2,5-dioxopentanoic reductaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt
10	2.8.3.a	alpha-ketoglutarat	alpha-ketoglutaryl-	alpha-ketoglutarat CoA	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2,	*Clostridium kluyveri*	suxinat, 4-hydroxybutyrat, butyrat

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
			CoA	transferaza		EDK35586.1		
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Axitaminococcus fermentans*	glutarat
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoat
10	3.1.2.a	alpha-ketoglutarat	alpha-ketoglutaryl-CoA	alpha-ketoglutaryl-CoA hydrolaza	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipyl-CoA
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butyryl-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hydroxypropanoyl-CoA
10	6.2.1.a	alpha-ketoglutarat	alpha-ketoglutaryl-CoA	alpha-ketoglutaryl-CoA ligaza (hoặc alpha-ketoglutaryl-CoA syntetaza)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	suxinat
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	phenylaxetat
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxyhexanoat
10	1.2.1.b	alpha-ketoglutaryl-CoA	axit 2,5-dioxopentanoic	alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza (hoặc axit	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Suxinyl-CoA

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
				2,5-dioxopentanoic dehydrogenaza)				
					Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonyl-CoA
					bphG	BAA03892.1	*Pseudomonas sp*	Axetaldehyt, Propionaldehyt, Butyraldehyt, isobutyraldehyt và Formaldehyt
10	1.1.1.a	axit 2,5-dioxopentanoic	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza	*ADH2* *yqhD* *4hbd*	NP_014032.1 NP_417484.1 L21902.1	*Saccharymyces cerevisiae* *Escherichia coli* *Clostridium kluyveri DSM 555*	nói chung >C3 Suxinat semialdehyt
10	1.1.1.c	alpha-ketoglutaryl-CoA	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic	alpha-ketoglutaryl-CoA reductaza (tạo thành rượu)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoyl-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Cloflexus aurantiacus*	malonyl-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	axyl-CoA mạch dài
10	4.1.1.a	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic	4-hydroxybutanal	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic	*pdc*	P06672.1	*Zymomonas mobilus*	axit 2-oxopentanoic

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
				decarboxylaza				
					mdlC	P209062	*Pseudomonas putida*	axit 2-oxopentanoic
					pdc1	P06169	*Saccharomyces cerevisiae*	Pyruvat
10	1.1.1.a	4-hydroxybutanal	1,4-butandiol	1,4-butandiol dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt
10	1.2.1.c	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic	4-hydroxybutyryl-CoA	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl)	*sucA, sucB, lpd*	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	*Escherichia coli*	Alpha-ketoglutarat
					bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	*Bacillus subtilis*	các dẫn xuất 2-keto axit của valin, leuxin và isoleuxin
					Bckdha, Bckdhb, Dbt, Dld	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	*Rattus norvegicus*	các dẫn xuất 2-keto axit của valin, leuxin và isoleuxin

Ví dụ 9

Ví dụ về các quá trình sản sinh BDO từ glutamat

Ví dụ này mô tả ví dụ về các quá trình sản sinh BDO từ glutamat.

Fig.11 mô tả ví dụ về các quá trình sản sinh BDO trong đó glutamat được biến đổi thành 1,4-butandiol. Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO này được liệt kê trong bảng 21, cùng với các gen tương ứng mã hóa các enzym này.

Nói tóm lại, glutamat có thể được biến đổi thành glutamyl-CoA bởi glutamat transferaza (EC 2.8.3.a), glutamyl-CoA hydrolaza (EC 3.1.2.a) hoặc glutamyl-CoA ligaza (hoặc glutamyl-CoA syntetaza) (EC 6.2.1.a). Ngoài ra, glutamat có thể được biến đổi thành glutamat-5-phosphat bởi glutamat 5-kinaza (EC 2.7.2.a). Glutamat-5-phosphat có thể được biến đổi thành glutamat-5-semialdehyt bởi glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa) (EC 1.2.1.d). Glutamyl-CoA có thể được biến đổi thành glutamat-5-semialdehyt bởi glutamyl-CoA reductaza (hoặc glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza) (EC 1.2.1.b). Glutamat-5-semialdehyt có thể được biến đổi thành axit 2-amino-5-hydroxypentanoic bởi glutamat-5-semialdehyt reductaza (EC 1.1.1.a). Ngoài ra, glutamyl-CoA có thể được biến đổi thành axit 2-amino-5-hydroxypentanoic bởi glutamyl-CoA reductaza (tạo thành rượu) (EC 1.1.1.c). Axit 2-amino-5-hydroxypentanoic có thể được biến đổi thành axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic bởi axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza (khử amin) (EC 1.4.1.a) hoặc axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza (EC 2.6.1.a). Axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza (EC 4.1.1.a). 4-Hydroxybutanal có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 1,4-butandiol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a). Ngoài ra, axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-CoA bởi axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl) (EC 1.2.1.c).

Bảng 21. Quá trình sản sinh BDO từ glutamat.

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
11	2.8.3.a	glutamat	glutamyl-CoA	glutamat CoA transferaza	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	suxinat, 4-hydroxybutyrat, butyrat
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Axitaminococcus fermentans*	glutarat
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoat
11	3.1.2.a	glutamat	glutamyl-CoA	glutamyl-CoA hydrolaza	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipyl-CoA
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butyryl-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hydroxypropanoyl-CoA
11	6.2.1.a	glutamat	glutamyl-CoA	glutamyl-CoA ligaza (hoặc glutamyl-CoA syntetaza)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	suxinat
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	phenylaxetat
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxyhexanoat
11	2.7.2.a	glutamat	glutamat-5-	glutamat 5-kinaza	*ackA*	NP_416799.1	*Escherichia coli*	axetat, propionat

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
			phosphat					
					buk1	NP_349675	*Clostridium acetobutylicum*	butyrat
					proB	NP_414777.1	*Escherichia coli*	glutamat
11	1.2.1.d	glutamat-5-phosphat	glutamat-5-semialdehyt	glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza (phosphoryl hóa)	*proA*	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamyl-5-phosphat
					asd	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartyl-phosphat
					gapA	P0A9B22	*Escherichia coli*	Glyxeraldehyt-3-phosphat
11	1.2.1.b	glutamyl-CoA	glutamat-5-semialdehyt	glutamyl-CoA reductaza (hoặc glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza)	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Suxinyl-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonyl-CoA
					bphG	BAA03892.1	*Pseudomonas sp*	Axetaldehyt, Propionaldehyt, Butyraldehyt, isobutyraldehyt và

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
								Formaldehyt
11	1.1.1.a	glutamat-5-semialdehyt	axit 2-amino-5-hydroxypentanoic	glutamat-5-semialdehyt reductaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt
11	1.1.1.c	glutamyl-CoA	axit 2-amino-5-hydroxypentanoic	glutamyl-CoA reductaza (tạo thành rượu)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoyl-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Cloflexus aurantiacus*	malonyl-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	axyl-CoA mạch dài
11	1.4.1.a	axit 2-amino-5-hydroxypentanoic	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic	axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza (khử amin)	*gdhA*	P00370	*Escherichia coli*	glutamat
					ldh	P0A393	*Bacillus cereus*	leuxin, isoleuxin, valin, 2-aminobutanoat

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
					nadX	NP_229443.1	*Thermotoga maritima*	Aspartat
11	2.6.1.a	axit 2-amino-5-hydroxypentanoic	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic	axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza	*aspC*	NP_415448.1	*Escherichia coli*	Aspartat
					AAT2	P235423	*Saccharomyces cerevisiae*	Aspartat
					avtA	YP_026231.1	*Escherichia coli*	valin, alpha-aminobutyrat
11	4.1.1.a	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic	4-hydroxybutanal	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza	*pdc*	P06672.1	*Zymomonas mobilus*	axit 2-oxopentanoic
					mdlC	P209062	*Pseudomonas putida*	axit 2-oxopentanoic
					pdc1	P06169	*Saccharomyces cerevisiae*	Pyruvat
11	1.1.1.a	4-hydroxybutanal	1,4-butandiol	1,4-butandiol dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
11	1.2.1.c	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic	4-hydroxybutyryl-CoA	axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza (khử carboxyl)	*sucA, sucB, lpd*	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	*Escherichia coli*	Alpha-ketoglutarat
					bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	*Bacillus subtilis*	các dẫn xuất 2-keto axit của valin, leuxin và isoleuxin
					Bckdha, Bckdhb, Dbt, Dld	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	*Rattus norvegicus*	các dẫn xuất 2-keto axit của valin, leuxin và isoleuxin

Ví dụ 10

Ví dụ về quá trình sản sinh BDO từ axetoaxetyl-CoA

Ví dụ này mô tả quá trình sản sinh BDO từ axetoaxetyl-CoA.

Fig.12 mô tả ví dụ về các quá trình sản sinh BDO trong đó axetoaxetyl-CoA được biến đổi thành 1,4-butandiol. Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO này được liệt kê trong bảng 22, cùng với các gen tương ứng mã hóa các enzym này.

Nói tóm lại, axetoaxetyl-CoA có thể được biến đổi thành 3-hydroxybutyryl-CoA bởi 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza (EC 1.1.1.a). 3-Hydroxybutyryl-CoA có thể được biến đổi thành crotonoyl-CoA bởi 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza (EC 4.2.1.a). Crotonoyl-CoA có thể được biến đổi thành vinylaxetyl-CoA bởi vinylaxetyl-CoA Δ-isomeraza (EC 5.3.3.3). Vinylaxetyl-CoA có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-CoA bởi 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza (EC 4.2.1.a). 4-Hydroxybutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) (EC 1.1.1.c). Ngoài ra, 4-hydroxybutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza) (EC 1.2.1.b). 4-Hydroxybutanal có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 1,4-butandiol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a).

Bảng 22. Quá trình sản sinh BDO từ axetoaxetyl-CoA.

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
12	1.1.1.a	axetoaxetyl-CoA	3-hydroxybutyryl-CoA	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenaza	*hbd*	NP_349314.1	*Clostridium acetobutylicum*	3-hydroxybutyryl-CoA
					hbd	AAM14586.1	*Clostridium beijerinckii*	3-hydroxybutyryl-CoA
					Msed_1423	YP_001191505	*Metallosphaera sedula*	presumed 3-hydroxybutyryl-CoA
12	4.2.1.a	3-hydroxybutyryl-CoA	crotonoyl-CoA	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza	*crt*	NP_349318.1	*Clostridium acetobutylicum*	3-hydroxybutyryl-CoA
					maoC	NP_415905.1	*Escherichia coli*	3-hydroxybutyryl-CoA
					paaF	NP_415911.1	*Escherichia coli*	3-hydroxyadipyl-CoA
12	5.3.3.3	crotonoyl-CoA	vinylaxetyl-CoA	vinylaxetyl-CoA Δ-isomeraza	*abfD*	YP_001396399.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	4-hydroxybutyryl-CoA
					abfD	P55792	*Clostridium aminobutyricum*	4-hydroxybutyryl-CoA
					abfD	YP_001928843	*Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*	4-hydroxybutyryl-CoA

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
12	4.2.1.a	vinylaxetyl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza	*abfD*	YP_001396399.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	4-hydroxybutyryl-CoA
					abfD	P55792	*Clostridium aminobutyricum*	4-hydroxybutyryl-CoA
					abfD	YP_001928843	*Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*	4-hydroxybutyryl-CoA
12	1.1.1.c	4-hydroxybutyryl-CoA	1,4-butandiol	4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoyl-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Cloflexus aurantiacus*	malonyl-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	axyl-CoA mạch dài
12	1.2.1.b	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutanal	4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza)	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Suxinyl-CoA
					sucD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	Suxinyl-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonyl-CoA
12	1.1.1.a	4-hydroxybutan	1,4-butandiol	1,4-butandiol	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces*	nói chung

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
		al		dehydrogenaza			*cerevisiae*	
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt

Ví dụ 11

Ví dụ về quá trình sản sinh BDO từ homoserin

Ví dụ này mô tả về quá trình sản sinh BDO từ homoserin.

Fig.13 mô tả ví dụ về các quá trình sản sinh BDO trong đó homoserin được biến đổi thành 1,4-butandiol. Các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO này được liệt kê trong bảng 23, cùng với các gen tương ứng mã hóa các enzym này.

Nói tóm lại, homoserin có thể được biến đổi thành 4-hydroxybut-2-enoat bởi homoserin deaminaza (EC 4.3.1.a). Ngoài ra, homoserin có thể được biến đổi thành homoserin-CoA by homoserin CoA transferaza (EC 2.8.3.a), homoserin-CoA hydrolaza (EC 3.1.2.a) hoặc homoserin-CoA ligaza (hoặc homoserin-CoA syntetaza) (EC 6.2.1.a). Homoserin-CoA có thể được biến đổi thành 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA bởi homoserin-CoA deaminaza (EC 4.3.1.a). 4-Hydroxybut-2-enoat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA bởi 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA transferaza (EC 2.8.3.a), 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA hydrolaza (EC 3.1.2.a) hoặc 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA ligaza (hoặc 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA syntetaza) (EC 6.2.1.a). Ngoài ra, 4-hydroxybut-2-enoat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyrat bởi 4-hydroxybut-2-enoat reductaza (EC 1.3.1.a). 4-Hydroxybutyrat có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-coA bởi 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza (EC 2.8.3.a), 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza (EC 3.1.2.a) hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza (hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA syntetaza) (EC 6.2.1.a). 4-Hydroxybut-2-enoyl-CoA có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutyryl-CoA bởi 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA reductaza (EC 1.3.1.a). 4-Hydroxybutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu) (EC 1.1.1.c). Ngoài ra, 4-hydroxybutyryl-CoA có thể được biến đổi thành 4-hydroxybutanal bởi 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza) (EC 1.2.1.b). 4-Hydroxybutanal có thể được biến đổi thành 1,4-butandiol bởi 1,4-butandiol dehydrogenaza (EC 1.1.1.a).

Bảng 23. Quá trình sản sinh BDO từ homoserin.

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
13	4.3.1.a	homoserin	4-hydroxybut-2-enoat	homoserin deaminaza	*aspA*	NP_418562	*Escherichia coli*	Aspartat
					aspA	P44324.1	*Haemophilus influenzae*	Aspartat
					aspA	P07346	*Pseudomonas fluorescens*	Aspartat
13	2.8.3.a	homoserin	homoserin-CoA	homoserin CoA transferaza	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	suxinat, 4-hydroxybutyrat, butyrat
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Axitaminococcus fermentans*	glutarat
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoat
13	3.1.2.a	homoserin	homoserin-CoA	homoserin-CoA hydrolaza	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipyl-CoA
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butyryl-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hydroxypropanoyl-CoA
13	6.2.1.a	homoserin	homoserin-CoA	homoserin-CoA ligaza (hoặc homoserin-CoA syntetaza)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	suxinat

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	phenylaxetat
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxyhexanoat
13	4.3.1.a	homoserin-CoA	4-hydroxybut-2-enoyl-CoA	homoserin-CoA deaminaza	*acl1*	CAG29274.1	*Clostridium propionicum*	beta-alanyl-CoA
					acl2	CAG29275.1	*Clostridium propionicum*	beta-alanyl-CoA
					MXAN_4385	YP_632558.1	*Myxococcus xanthus*	beta-alanyl-CoA
13	2.8.3.a	4-hydroxybut-2-enoat	4-hydroxybut-2-enoyl-CoA	4-hydroxybut-2-enoyl-CoA transferaza	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	suxinat, 4-hydroxybutyrat, butyrat
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Axitaminococcus fermentans*	glutarat
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoat
13	3.1.2.a	4-hydroxybut-2-enoat	4-hydroxybut-2-enoyl-CoA	4-hydroxybut-2-enoyl-CoA hydrolaza	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipyl-CoA
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butyryl-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hydroxypropanoyl-CoA

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
13	6.2.1.a	4-hydroxybut-2-enoat	4-hydroxybut-2-enoyl-CoA	4-hydroxybut-2-enoyl-CoA ligaza (hoặc 4-hydroxybut-2-enoyl-CoA syntetaza)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	suxinat
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	phenylaxetat
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxyhexanoat
13	1.3.1.a	4-hydroxybut-2-enoat	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybut-2-enoat reductaza	*enr*	CAA71086.1	*Clostridium tyrobutyricum*	
					enr	CAA76083.1	*Clostridium kluyveri*	
					enr	YP_430895.1	*Moorella thermoaxetica*	
13	2.8.3.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-coA	4-hydroxybutyryl-CoA transferaza	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	suxinat, 4-hydroxybutyrat, butyrat
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Axitaminococcus fermentans*	glutarat
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoat
13	3.1.2.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-	4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipyl-CoA

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
			coA					
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butyryl-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hydroxypropanoyl-CoA
13	6.2.1.a	4-hydroxybutyrat	4-hydroxybutyryl-coA	4-hydroxybutyryl-CoA ligaza (hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA syntetaza)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	suxinat
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	phenylaxetat
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxyhexanoat
13	1.3.1.a	4-hydroxybut-2-enoyl-CoA	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybut-2-enoyl-CoA reductaza	*bcd, etfA, etfB*	NP_349317.1, NP_349315.1, NP_349316.1	*Clostridium acetobutylicum*	
					TER	Q5EU90.1	*Euglena gracilis*	
					TDE0,597	NP_971211.1	*Treponema denticola*	
8	1.1.1.c	4-hydroxybutyryl-CoA	1,4-butandiol	4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo thành rượu)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoyl-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Cloflexus aurantiacus*	malonyl-CoA

Fig	Mã phân loại EC	Cơ chất mong muốn	Sản phẩm mong muốn	Danh pháp enzym	Danh pháp gen	Số đăng ký GenBank (nếu có)	Vi sinh vật	Cơ chất đã biết
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	axyl-CoA mạch dài
8	1.2.1.b	4-hydroxybutyryl-CoA	4-hydroxybutanal	4-hydroxybutyryl-CoA reductaza (hoặc 4-hydroxybutanal dehydrogenaza)	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Suxinyl-CoA
					sucD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	Suxinyl-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonyl-CoA
8	1.1.1.a	4-hydroxybutanal	1,4-butandiol	1,4-butandiol dehydrogenaza	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	nói chung
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Suxinat semialdehyt

Ví dụ 12

Chủng vi sinh vật sản sinh BDO biểu hiện suxinyl-CoA syntetaza

Ví dụ này mô tả việc tăng quá trình sản sinh BDO ở các chủng sản sinh BDO biểu hiện suxinyl-CoA syntetaza.

Như được bộc lộ nêu trên, suxinat có thể là tiền chất cho quá trình sản sinh BDO bằng cách biến đổi thành suxinyl-CoA (cũng tham khảo, WO2008/115840, WO 2009/023493, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0075351). Do đó, chủng vi sinh vật chủ này được cải biến di truyền để biểu hiện quá mức các gen *sucCD* của *E. coli*, mã hóa cho suxinyl-CoA syntetaza. Trình tự nuleotit của operon *sucCD* của *E. coli* được thể hiện trên Fig.14A và các trình tự axit amin đối với các tiểu đơn vị suxinyl-CoA syntetaza được mã hóa được thể hiện trên các Fig.14B và 14C. Nói tóm lại, các gen *sucCD* của *E. coli* được tách dòng bằng PCR từ ADN nhiễm sắc thể của *E. coli* và được chèn vào các plasmit đa bản sao pZS*13, pZA13 và pZE33 phía sau trình tự khởi đầu PA1lacO-1 (Lutz and Bujard, *Nucleic Axits Res.* 25:1203-1210 (1997)) bằng cách sử dụng các quy trình sinh học phân tử tiêu chuẩn.

Các gen *sucCD* của *E. coli*, mã hóa cho suxinyl-CoA syntetaza, đã được biểu hiện quá mức. Các kết quả cho thấy quá trình chèn vào các chủng *sucCD* để biểu hiện suxinyl-CoA syntetaza đã cải thiện quá trình sản sinh BDO ở các chủng khác nhau so với hoặc mức độ biểu hiện tự nhiên hoặc mức độ biểu hiện của *cat1*, mà là suxinyl-CoA/axetyl-CoA transferaza. Do đó, quá trình sản sinh BDO được cải thiện thông quá quá trình biểu hiện quá mức gen *sucCD* có nguồn gốc tự nhiên từ *Gen sucCD của E. coli* mã hóa suxinyl-CoA syntetaza.

Ví dụ 13

Quá trình biểu hiện các gen không tương đồng mã hóa các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO.

Ví dụ này mô tả quá trình biểu hiện các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO không có nguồn gốc tự nhiên khác nhau để cải thiện quá trình sản sinh BDO.

Alpha-ketoglutarat decarboxylaza.

Gen *sucA* của *Mycobacterium bovis* mã hóa alpha-ketoglutarat decarboxylaza được biểu hiện ở các chủng vi sinh vật chủ. Quá trình biểu hiện quá mức *M. bovis sucA* đã cải thiện quá trình sản sinh BDO (cũng tham khảo WO2008/115840, WO 2009/023493, công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, công bố đơn của Mỹ số 2009/0075351). Trình tự nucleotit và trình tự axit amin của *M. bovis sucA* và alpha-ketoglutarat decarboxylaza đã được mã hóa được thể hiện trên Fig.15.

Để tạo ra các chủng biểu hiện gen *sucA* của *M. bovis*, các đoạn gen của *sucGen* mã hóa alpha-ketoglutarat decarboxylaza được khuếch đại từ ADN bộ gen của *Mycobacterium bovis* BCG (ATCC 19015; American Type Culture Collection, Manassas VA) sử dụng các mồi được thể hiện dưới đây. Toàn bộ chiều dài của gen được lắp ráp ra bằng phản ứng nối bốn đoạn ADN đã được khuếch đại và tách dòng vào các vectơ biểu hiện pZS*13 và pZE23 phía sau trình tự khởi đầu $P_{A1lacO-1}$ (Lutz and Bujard, *Nucleic Axits Res.* 25:1203-1210 (1997)). Trình tự nuleotit của gen đã được lắp ráp được kiểm chứng bằng phương pháp giải trình tự AND.

Các đoạn mồi cho đoạn 1:

5'-ATGTACCGCAAGTTCCGC-3' (SEQ ID NO:)

5'-CAATTTGCCGATGCCCAG-3' (SEQ ID NO:)

Các mồi cho đoạn 2:

5'-GCTGACCACTGAAGACTTTG-3' (SEQ ID NO:)

5'-GATCAGGGCTTCGGTGTAG-3' (SEQ ID NO:)

Các đoạn mồi cho đoạn 3:

5'-TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTC-3' (SEQ ID NO:)

5'-TCAGCCGAACGCCTCGTCGAGGATCTCCTG-3' (SEQ ID NO:)

Các đoạn mồi cho đoạn 4:

5'-TGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAAC-3' (SEQ ID NO:)

5'-TCTCTTCAACCAGCCATTCGTTTTGCCCG-3' (SEQ ID NO:)

Quá trình biểu hiện chức năng của alpha-ketoglutarat decarboxylaza được chứng minh bằng cách sử dụng cả thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Hoạt tính enzym SucA được xác định theo phương pháp đã được đề cập trước đó (Tian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 102:10670-10675 (2005)). Hỗn hợp phản ứng chứa 50mM đệm kali phosphat, pH 7,0, 0,2mM thiamin pyrophosphat, 1mM $MgCl_2$, 0,8mM ferixyanit, 1mM alpha-ketoglutarat và dịch phân giải thô của tế bào. Hoạt tính enzym này được kiểm soát bằng quá trình khử ferixyanit ở bước sóng 430nm. Hoạt tính *in vivo* của enzym SucA được kiểm chứng bằng cách sử dụng toàn bộ canh trường tế bào *E. coli*. Các khuẩn lạc đơn của *E. coli* MG1655 $lacI^q$ được biến nạp với các plasmit mã hóa enzym SucA và 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza (4Hbd) được ủ với 5mL môi trường LB chứa các kháng sinh thích hợp. Các tế bào được nuôi cấy qua đêm trong điều kiện hiếu khí ở nhiệt độ 37°C. 200µL canh trường nuôi cấy qua đêm này được bổ sung vào 8mL môi trường tối thiểu M9 (6,78g/L Na_2HPO_4, 3,0g/L KH_2PO_4, 0,5g/L NaCl, 1,0g/L NH_4Cl, 1mM $MgSO_4$, 0,1mM $CaCl_2$) được bổ sung với 20g/L glucoza, 100mM axit 3-(N-morpholino)propansulfonic (MOPS) để cải thiện dung lượng đệm, 10 µg/mL thiamin và các kháng sinh thích hợp. Ban đầu, các điều kiện vi hiếu khí có thể được tạo ra bằng cách sục khí nitơ vào các bình nuôi cấy kỵ khí được bịt kín trong 5 phút, sau đó xuyên qua thành bình nuôi cấy bằng kim 23G sau khi cấy chuyển. Kim này được giữ trong bình nuôi cấy trong quá trình phát triển của vi sinh vật cho phép lượng nhỏ không khí thâm nhập vào các bình này. Quá trình biểu hiện protein được cảm ứng bằng 0,2mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) khi chủng nuôi cấy đã đạt được pha sinh trưởng logarit trung bình. Đối với các mẫu đối chứng, các chủng *E. coli* MG1655 $lacI^q$ chỉ được biến nạp với plasmit mã hóa 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza và chỉ các vectơ trống được nuôi cấy trong điều kiện tương tự (tham khảo, bảng 23). Quá trình tích tụ 4-hydroxybutyrat (4-HB) trên môi trường nuôi cấy được kiểm soát bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LCMS). Chỉ chủng *E. coli* biểu hiện alpha-ketoglutarat decarboxylaza *Mycobacterium* là sinh tổng hợp lượng đáng kể 4-hydroxybutyrat (tham khảo, Fig.16).

Bảng 24. Các chủng này chứa các đối chứng plasmit khác nhau và mã hóa *sucA* và 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza.

	Vi sinh vật chủ	**pZE13**	**pZA33**
1	MG1655lacIq	vectơ	vectơ
2	MG1655lacIq	vectơ	4hbd
3	MG1655lacIq	sucA	4hbd

Thử nghiệm riêng biệt đã chứng minh rằng quá trình alpha-ketoglutarat decarboxylaza thực hiện chức năng độc lập với chu trình khử TCA. Chủng *E. coli* ECKh-

401 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA) được sử dụng làm chủng vi sinh vật chủ (tham khảo, Bảng 25). Toàn bộ ba cấu trúc chứa gen mã hóa 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza (4Hbd). Cấu trúc 1 cũng chứa gen mã hóa alpha-ketoglutarat decarboxylaza (*sucA*). Cấu trúc 2 chứa các gen mã hóa suxinyl-CoA syntetaza (*sucCD*) và suxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA (*sucD*), mà cần thiết cho quá trình sản sinh 4-hydroxybutyrat thông qua chu trình khử TCA. Cấu trúc 3 chứa tất cả các gen từ 1 và 2. Ba chủng *E. coli* này được nuôi cấy trong các điều kiện tương tự như được mô tả nêu trên ngoại trừ chủng thứ hai được nuôi cấy trong điều kiện vi hiếu khí. Do biểu hiện enzym SucA, cấu trúc 3 sinh tổng hợp 4-hydroxybutyrat nhiều hơn so với cấu trúc 2, dựa trên chu trình khử TCA để sinh tổng hợp 4-hydroxybutyrat (tham khảo, Fig.17).

Để tiếp tục hỗ trợ cho sự đóng góp của alpha-ketoglutarat decarboxylaza để sinh tổng hợp 4-hydroxybutyrat và 1,4-butandiol được đề xuất bằng các thử nghiệm phân tích chu trình. Các chủng ECKh-432, mà chứa cả *sucCD-sucD* và *sucA* trên nhiễm sắc thể, được nuôi cấy trên môi trường tối thiểu M9 chứa hỗn hợp 1-13C-glucoza (60%) và U-13C-glucoza (40%). Thu sinh khối, protein được phân lập và thủy phân thành các axit amin và quá trình phân bố đánh dấu của các axit amin được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GCMS) như được mô tả trước đó (Fischer and Sauer, *Eur. J. Biochem.* 270:880-891 (2003)). Ngoài ra, quá trình phân bố đánh dấu của 4-hydroxybutyrat và 1,4-butandiol được tiết ra được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GCMS) như được mô tả trong WO2008115840 A2. Dữ liệu này được sử dụng để tính toán phân bố chu trình bên trong tế bào bằng cách sử dụng các phương pháp đã được thiết lập (Suthers et al., *Metab. Eng.* 9:387-405 (2007)). Các kết quả này cho thấy rằng từ 56% đến 84% alpha-ketoglutarat được chuyển thông qua alpha-ketoglutarat decarboxylaza vào quá trình sản sinh BDO. Phần còn lại được oxi hóa bởi alpha-ketoglutarat dehydrogenaza, mà sau đó tham gia vào quá trình sản sinh BDO thông qua suxinyl-CoA.

Các kết quả này chứng minh các chủng sinh tổng hợp 4-hydroxybutyrat chứa gen *sucA* từ *Mycobacterium bovis* BCG đã được biểu hiện trên plasmit. Khi plasmit mã hóa cho gen này không có mặt, quá trình sản sinh 4-hydroxybutyrat là không đáng kể khi gen *sucD* (suxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA) không được biểu hiện. Gen *sucD* từ *M. bovis* là gen tương đồng chặt chẽ với gen *sucD* từ *Mycobacterium tuberculosis*

sản phẩm enzym của các gen này đã được mô tả đặc tính trước đó (Tian et al., *supra*, 2005).

Suxinat semialdehyt dehydrogenaza (phụ thuộc CoA), 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza và 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza.

Các gen từ *Porphyromonas gingivalis* W83 có thể là các thành phần hữu hiệu của quá trình sinh tổng hợp 1,4-butandiol (cũng tham khảo WO2008/115840, WO 2009/023493, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0075351). Trình tự nuleotit của Suxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA (*sucD*) từ *Porphyromonas gingivalis* được thể hiện trên Fig.18A và trình tự axit amin đã được mã hóa được thể hiện trên Fig.18B. Trình tự nuleotit của 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza (*4hbd*) từ *Porphymonas gingivalis* được thể hiện trên Fig.19A và trình tự axit amin đã được mã hóa được thể hiện trên Fig.19B. Trình tự nuleotit của 4-hydroxybutyrat CoA transferaza (*cat2*) từ *Porphyromonas gingivalis* được thể hiện trên Fig.20A và trình tự axit amin đã được mã hóa được thể hiện trên Fig.20B.

Nói tóm lại, các gen từ *Porphyromonas gingivalis* W83 mã hóa suxinat semialdehyt dehydrogenaza (phụ thuộc CoA) và 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza và trong một số trường hợp bổ sung là 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA, có thể được tách dòng bằng PCR từ ADN nhiễm sắc thể của *P. gingivalis* và được chèn vào các plasmit đa bản sao pZS*13, pZA13 và pZE33 phía sau trình tự khởi động PA1lacO-1 (Lutz and Bujard, *Nucleic Axits Res.* 25:1203-1210 (1997)) bằng cách sử dụng các quy trình sinh học phân tử tiêu chuẩn. Sau đó, các plasmit này được chèn vào các chủng vi sinh vật chủ.

Các gen của W83 *Porphyromonas gingivalis* được chèn vào các chủng sinh tổng hợp như được mô tả nêu trên. Một số chủng chỉ bao gồm suxinat semialdehyt dehydrogenaza (phụ thuộc CoA) và 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza without 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza.

Butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza.

Các enzym butyrat kinaza (BK) và phosphotransbutyrylaza (PTB) có thể được sử dụng để sinh tổng hợp 4-hydroxybutyryl-CoA (cũng tham khảo WO2008/115840, WO 2009/023493, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, Công bố đơn của Mỹ số

2009/0075351). Đặc biệt là, các gen *buk1* và *ptb* của *Clostridium acetobutylicum*, có thể được sử dụng làm một phần của quá trình sinh tổng hợp 1,4-butandiol chức năng.

Các thử nghiệm ban đầu bao gồm thử nghiệm tách dòng và biểu hiện các gen PTB (020) và BK (021) của *C. acetobutylicum* có trong tự nhiên ở *E. coli*. Ở vị trí được yêu cầu, các bộ ba mã hóa khởi đầu và bộ ba mã hóa kết thúc đối với mỗi gen này được cải biến tương ứng thành "ATG" và "TAA", để biểu hiện tối ưu hơn ở *E. coli*. Các trình tự gen (020N và021N) của *C. acetobutylicum* và các trình tự peptit được dịch mã tương ứng của chúng được thể hiện trên các Fig. 21 và 22.

Các gen PTB và BK tồn tại ở *C. acetobutylicum* là một operon, với gen PTB (020) được biểu hiện trước tiên. Hai gen này được liên kết bởi trình tự "atta aagttaagtg gaggaatgtt aac" (SEQ ID NO:) mà bao gồm vị trí liên kết ribosom tái kích hoạt cho gen xuôi chiều BK (021). Hai gen ở vùng này được dung hợp với các trình tự khởi động được kiểm soát lac trên các vectơ biểu hiện để biểu hiện ở *E. coli* (Lutz and Bujard, *Nucleic Axits Res.* 25:1203-1210 (1997)).

Quá trình biểu hiện của hai protein từ các cấu trúc vectơ này được tìm thấy là thấp so với các gen được biểu hiện ngoại sinh khác do tỷ lệ lớn của các bộ ba mã hóa ở các gen của *C. acetobutylicum* chỉ hiếm xảy ra ở *E. coli*. Do đó, các gen 020 và 021 mới được dự đoán là các bộ ba mã hóa hiếm gặp đã được gây đột biến để thay thế các bộ ba mã hóa được tái biểu hiện cao hơn ở các trình tự gen của *E. coli*. Phương pháp tối ưu bộ ba mã hóa này được dựa trên các thuật toán đã được mô tả trước đó (Sivaraman et al., *Nucleic Axits Res.* 36:e16(2008)). Phương pháp này dự đoán việc thay thế bộ ba mã hóa trong vùng với tần xuất xuất hiện của chúng khi được kết thúc bằng các bộ ba mã hóa nhất định ở hai mạch nhánh. Các trình tự gen thay thế đối với 020 (Fig.23) và 021 (Fig.24) đã được xác định trong đó tăng số lượng các bộ ba mã hóa hiếm gặp đã được thay thế bằng các bộ ba mã hóa phổ biến hơn (A<B<C<D) dựa trên tỷ lệ của chúng ở vùng bộ ba mã hóa lân cận. Không có đột biến ở trình tự peptit thực tế so với các trình tự peptit tự nhiên 020 và 021 đã được chèn vào các trình tự được dự báo này.

Sự cải thiện quá trình biểu hiện của các protein BK và PTB thu được từ quá trình tối ưu bộ ba mã hóa được thể hiện trên Fig.25A. Quá trình biểu hiện các trình tự gen có trong tự nhiên được thể hiện trên băng 2, trong khi đó quá trình biểu hiện của 020B-021B và 020C-021C được thể hiện tương ứng trên các băng 3 và 4. Mức độ biểu hiện protein

cao hơn ở các operon được tối ưu bộ ba mã hóa020B-021B (2021B) và 020C-021C (2021C) cũng đã dẫn đến làm tăng hoạt tính so với operon có trong tự nhiên (2021n) trong các dịch chiết thô của *E.coli* được biểu hiện tương đương. (Fig.25B).

Các operon được tối ưu bộ ba mã hóa đã được biểu hiện trên plasmit ở chủng ECKh-432 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis* fimD:: *gen sucA* của *M. bovis*, gen *4hbd* của *C. kluyveri*) cùng với aldehyt dehydrogenaza của *C. acetobutylicum* để thu được quá trình sản sinh BDO hoàn chỉnh. Nuôi cấy các tế bào trên môi trường tối thiểu M9 chứa 20g/L glucoza, sử dụng kim 23G để duy trì các điều kiện vi hiếu khí như được mô tả nêu trên. Quá trình biến đổi glucoza thành sản phẩm 1,4-butandiol cuối cùng thu được đã được xác định. Cũng xác định được sự tích tụ của gama-butyrylacton (GBL), là phân tử được sắp xếp lại cấu trúc một cách tự nhiên thu được từ 4-hydroxybutyryl-CoA, sản phẩm trung gian của cặp enzym PTB-BK. Fig.26 thể hiện quá trình biểu hiện của operon 2021n tự nhiên thu được theo các nồng độ 1,4-butandiol so với chức năng enzym thay thế, *Cat2* (034), mà có khả năng biến đổi 4-hydroxybutyrat và coA tự do thành 4-hydroxybutyryl-CoA. Nồng độ gama-butyrylacton của 034 là cao hơn đáng kể so với 2021n, gợi ý rằng enzym tạo ra có hoạt tính cao hơn PTB-BK được biểu hiện từ các gen có trong tự nhiên. Tuy nhiên nồng độ của cả 1,4-butandiol và gama-butyrylacton là cao hơn so với hoặc 034 hoặc 2021n khi các biến chủng 2021B và 2021C đã được tối ưu bộ ba mã hóa được biểu hiện, cho thấy rằng quá trình tối ưu bộ ba mã hóa của các gen mã hóa cho PTB và BK làm tăng đáng kể sự đóng góp của các enzym này vào quá trình sản sinh BDO ở *E. coli*.

Các kết quả này chứng minh rằng các enzym butyrat kinaza (BK) và phosphotransbutyrylaza (PTB) có thể được sử dụng để biến đổi 4-hydroxybutyrat thành 4-hydroxybutyryl-CoA. Điều này giúp loại bỏ sự cần thiết đối với enzym transferaza như 4-hydoxybutyryl-CoA/Axetyl-CoA transferaza, mà sẽ tạo ra một mol axetat trên một mol 4-hydroxybutyryl-CoA được tạo ra. Các enzym từ *Clostridium acetobutylicum* là có mặt ở một số chủng đã được thiết kế để sinh tổng hợp 1,4-butandiol.

4-hydroxybutyryl-CoA reductaza.

Gen *ald* của *Clostridium beijerinckii* có thể được sử dụng làm một phần của quá trình sản sinh BDO chức năng (cũng tham khảo WO2008/115840, WO 2009/023493,

Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0075351). Gen *ald* của *Clostridium beijerinckii* cũng có thể được sử dụng để làm giảm quá trình sản sinh etanol ở các chủng sinh tổng hợp 1,4-butandiol. Ngoài ra, biến dị *ald* được tối ưu bộ ba mã hóa đặc hiệu (GNM0025B) được tìm thấy để cải thiện quá trình sản sinh BDO.

Gen *ald* của *C. beijerinckii* có trong tự nhiên (025n) và và trình tự protein của enzym được dự báo được thể hiện trên Fig.27. Như đã quan sát thấy được đối với các gen PTB và BK của *Clostridium acetobutylicum* PTB and BK, quá trình biểu hiện của gen ald của *C. beijerinckii* có trong tự nhiên là rất thấp ở *E. coli*. Do đó, bốn biến dị đã được tối ưu bộ ba mã hóa cho gen này đã được dự báo. Các Fig.28A-28D thế hiện các trình tự gen thay thế đối với 025, trong đó tăng số lượng các bộ ba mã hóa hiếm gặp đã được thay thế bằng các bộ ba mã hóa phổ biến hơn (A<B<C<D) dựa trên tỷ lệ của chúng ở vùng bộ ba mã hóa lân cận (25A, P=0,05; 25B, P=0,1; 25C, P=0,15; 25D, P=1). Không có đột biến ở trình tự peptit thực tế sso với trình tự peptit tự nhiên 025 đã được chèn vào các trình tự được dự báo này. Quá trình tối ưu bộ ba mã hóa đã làm tăng đáng kể quá trình biểu hiện của gen *ald* của *C. beijerinckii* (tham khảo, Fig.29), mà dẫn đến làm tăng đáng kể quá trình biến đổi glucoza thành 1,4-butandiol ở các tế bào biểu hiện toàn bộ quá trình sản sinh BDO (Fig.30A).

Các gen đã được tối ưu bộ ba mã hóa và có trong tự nhiên đã được biểu hiện trên plasmit cùng với gen *Cat2* của *P. gingivalis*, ở chủng vi sinh vật chủ ECKh-432 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L ΔackA fimD:: gen sucCD của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis* fimD:: gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hbd* của *C. kluyveri*), do đó chứa toàn bộ quá trình sản sinh BDO. Các tế bào được nuôi cấy vi hiếu khí trên môi trường tối thiểu M9 chứa 20g/L glucoza như được mô tả nêu trên. Quá trình sản sinh BDO và etanol tương ứng bởi enzym Ald của *C. beijerinckii* (được biểu hiện tự gen biến dị đã được tối ưu bộ ba mã hóa 025B) được so với enzym AdhE2 của *C. acetobutylicum* (tham khảo, Fig.30B). Enzym AdhE2 của *C. acetobutylicum* (002C) đã sinh tổng hợp etanol cao gần gấp 4 lần so với 1,4-butandiol. Trong khi, enzym Ald của *C. beijerinckii* Ald (025B) (tiếp hợp với hoạt tính ADH ngoại sinh) đã sinh tổng hợp lượng 1,4-butandiol tương đương, nhưng tỷ lệ sinh tổng hợp 1,4-butandiol so với etanol đối với enzym này là ngược lại so với 002C. Điều này gợi ý rằng enzym Ald của *C. beijerinckii* là đặc hiệu hơn đối với 4-hydroxybutyryl-CoA qua axetyl-

CoA so với enzym AdhE2 của *C. acetobutylicum* và do đó enzym Ald là gen enzym được ưu tiên hơn để đưa vào quá trình sản sinh BDO.

Gen *ald* của *Clostridium beijerinckii* (Toth et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999)) đã được thử nghiệm làm gen tiềm năng để xúc tác quá trình biến đổi 4-hydroxybutyryl-CoA thành 4-hydroxybutanal. Hơn năm mươi enzym aldehyt dehydrogenaza đã được sàng lọc về hoạt tính của chúng để xúc tác quá trình biến đổi 4-hydroxybutyryl-CoA thành 4-hydroxybutyraldehyt. Gen *ald* của *Clostridium beijerinckii* được chọn để đưa vào các chủng sinh tổng hợp 1,4-butandiol do enzym này ưu tiên đối với cơ chất 4-hydroxybutyryl-CoA trái ngược với axetyl-CoA. Điều này là quan trọng bởi vì hầu hết các enzym khác có hoạt tính aldehyt dehydrogenaza (ví dụ, *adhE2* từ *C. acetobutylicum* (Fontaine et al., *J Bacteriol.* 184:821-830 (2002)) ưu tiên biến đổi axetyl-CoA thành axetaldehyt, do đó được biến đổi thành etanol. Việc sử dụng gen này của *C. beijerinckii* làm giảm lượng sản phẩm phụ etanol được sinh tổng hợp ở các vi sinh vật sản sinh 1,4-butandiol. Ngoài ra, phiên bản đã được tối ưu bộ ba mã hóa của gen này biểu hiện rất hiệu quả ở *E. coli* (Sivaraman et al., *Nucleic Axits Res.* 36:e16 (2008)).

4-hydroxybutanal reductaza.

Hoạt tính 4-hydroxybutanal reductaza của gen *adh1* từ *Geobacillus thermoglucosidasius* (M10EXG) đã được sử dụng. Điều này dẫn đến đã cải thiện quá trình sản sinh BDO bằng cách tăng hoạt tính 4-hydroxybutanal reductaza so với các mức độ ngoại sinh.

Nhiều enzym rượu dehydrogenaza đã được sàng lọc về hoạt tính của chúng để xúc tác quá trình khử 4-hydroxybutanal thành 1,4-butandiol. Hầu hết các enzym rượu dehydrogenaza có hoạt tính cao đối với butyraldehyt đã thể hiện hoạt tính thấp hơn đối với 4-hydroxybutyraldehyt. Một khác biệt đáng chú ý là gen *adh1* từ *Geobacillus thermoglucosidasius* M10EXG (Jeon et al., *J. Biotechnol.* 135:127-133 (2008)) (GNM0084), mà thể hiện hoạt tính cao đối với cả 4-hydroxybutanal và butanal.

Trình tự gen tự nhiên và trình tự protein được mã hóa nếu sử dụng gen *adh1* từ *Geobacillus thermoglucosidasius* được thể hiện trên Fig.31. Gen *ald1* của *G. thermoglucosidasius* đã được biểu hiện ở *E. coli*.

Enzym *Adh1* (084) đã được biểu hiện rất hiệu quả từ gen tự nhiên của nó ở *E. coli* (tham khảo, Fig.32A). Trong các thử nghiệm enzym ADH, enzym được biểu hiện ở *E. coli* này đã thể hiện hoạt tính khử rất cao khi butyraldehyt hoặc 4-HB-aldehyt đã được sử dụng làm các cơ chất (tham khảo, Fig.32B). Các trị số Km được xác định cho các cơ chất này tương ứng là 1,2mM và 4,0mM. Các trị số hoạt tính này cho thấy rằng enzym *Adh1* là có hoạt tính cao nhất trong quá trình khử 4-HB-aldehyt của tất cả các enzym tiềm năng đã được thử nghiệm.

Enzym 084 đã được thử nghiệm về hoạt tính của chúng để tăng sinh tổng hợp 1,4-butandiol khi được liên hợp với gen *ald* của *C. beijerinckii*. Gen 084 được chèn vào phía sau gen *ald* biến dị 025B của *C. beijerinckii* để tạo thành operon tổng hợp mà dẫn đến quá trình biểu hiện được liên hợp của cả hai gen này. Các cấu trúc tương tự liên hợp 025B với các gen ADH tiềm năng khác và hiệu quả của các cấu trúc bao gồm mỗi ADH với 025B trong quá trình sản sinh BDO đã được thử nghiệm. Chủng vi sinh vật chủ được sử dụng là ECKh-459 (ΔadhE ldhA ΔpflB ΔlpdA::fnr-pflB6-K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis* fimD:: gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hdb* của *C. kluyveri* fimD:: gen *buk1* của *C. acetobutylicum*, gen *ptb* của *C. acetobutylicum*), mà chứa phần còn lại của quá trình sản sinh BDO trên nhiễm sắc thể. Enzym 084 ADH được biểu hiện tiếp hợp với 025B đã cho thấy lượng 1,4-butandiol cao nhất (mũi tên bên phải trên Fig.33) khi so với chỉ 025B (mũi tên bên trái trên Fig.33) và tiếp hợp với các chức năng ADH ngoại sinh. Enzym này cũng sinh tổng hợp 1,4-butandol nhiều hơn các enzym ADH khác khi được liên hợp với 025B, được chỉ ra như sau: 026A-C, biến dị đã được tối ưu bộ ba mã hóa butanol dehydrogenaza của *Clostridium acetobutylicum*; 050, rượu dehydrogenaza I của *Zymomonas mobilis*; 052, 1,3-propandiol dehydrogenaza của *Citrobacter freundii*; 053, 1,3-propandiol dehydrogenaza của *Lactobacillus brevis*; 057, lactaldehyt reductaza của *Bacteroides fragilis*; 058, 1,3-propandiol dehydrogenaza của *E. coli*; 071, 168 alpha-ketoglutarat semialdehyt dehydrogenaza của *Bacillus subtilis*. Các cấu trúc được đánh dấu "PT5lacO" là các cấu trúc trong đó các gen được chỉ huy bởi trình tự khởi đầu PT5lacO. Trong tất cả các trường hợp khác, trình tự khởi đầu PA1lacO-1 được sử dụng. Điều này cho thấy rằng việc tạo ra enzym 084 ADH trong quá trình sản sinh BDO đã làm tăng tổng hợp 1,4-butandiol.

Ví dụ 14

Chủng vi sinh vật sản sinh 1,4-butandiol biểu hiện pyruvat dehydrogenaza.

Ví dụ này mô tả quá trình sử dụng pyruvat dehydrogenaza (PDH) để cải thiện quá trình sản sinh BDO. Quá trình biểu hiện không tương đồng của gen *lpdA* của *Klebsiella pneumonia* được sử dụng để cải thiện quá trình sản sinh BDO.

Theo tính toán, quá trình biến đổi pyruvat thành axetyl-CoA tạo ra NADH là cần thiết để đạt được hiệu suất lý thuyết tối đa của 1,4-butandiol (cũng tham khảo WO2008/115840, WO 2009/023493, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0075351; WO 2008/018930; Kim et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1766-1771 (2007); Kim et al., *J. Bacteriol.* 190:3851-3858 (2008); Menzel et al., *J. Biotechnol.* 56:135-142 (1997)). Việc thiếu hoạt tính pyruvat dehydrogenaza (PDH) đã được chứng minh là làm giảm 11% hiệu suất lý thuyết kỵ khí tối đa của 1,4-butandiol nếu hoạt tính phosphoenolpyruvat carboxykinaza (PEPCK) không thể đạt được và giảm 3% nếu hoạt tính PEPCK có thể đạt được. Tuy nhiên, quan trọng hơn, sự thiếu hụt hoạt tính pyruvat dehydrogenaza (PDH) ở chủng OptKnock #439, được mô tả trong WO 2009/023493 và Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, mà có sự loại bỏ của ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH và PFLi, sẽ làm giảm hiệu suất kỵ khí tối đa của 1,4-butandiol xuống 54% hoặc 43% nếu hoạt tính PEPCK tương ứng là vắng mặt hoặc có mặt. Với sự có mặt của chất nhận điện tử bên ngoài, việc thiếu hụt hoạt tính pyruvat dehydrogenaza (PDH) sẽ làm giảm hiệu suất tối đa của chủng được loại bỏ gen này xuống 10% hoặc 3% giả định rằng hoạt tính PEPCKtương ứng là vắng mặt hoặc có mặt.

Pyruvat dehydrogenaza (PDH) là một trong số các enzym phức tạp nhất của quá trình chuyển hóa chủ yếu và bao gồm 24 bản sao của pyruvat decarboxylaza (E1) và 12 phân tử của dihydrolipoyl dehydrogenaza (E3), mà liên kết với mặt ngoài của tâm dihydrolipoyl transaxetylaza (E2). Pyruvat dehydrogenaza bị ức chế bởi các tỷ lệ NADH/NAD, ATP/ADP và Axetyl-CoA/CoA cao. Enzym pyruvat dehydrogenaza có trong tự nhiên thể hiện hoạt tính rất thấp trong các điều kiện hạn chế khí oxi hoặc kỵ khí ở các vi sinh vật như *E. coli* do phần lớn nhạy với NADH là E3, được mã hóa bởi *lpdA*. Để đạt được mục tiêu này, phiên bản nhảy cảm với NADH của gen *lpdA* từ *Klebsiella pneumonia* đã được tách dòng và biểu hiện để tăng hoạt tính của pyruvat dehydrogenaza trong các điều kiện ở đó tỷ lệ NADH/NAD được kỳ vọng là cao.

Thay thế *lpdA* tự nhiên.

Operon mã hóa cho pyruvat dehydrogenaza của *Klebsiella pneumoniae* có độ tương đồng nằm trong khoảng từ 78 đến 95% về mức độ nucleotit với operon tương đương của *E. coli*. Đã được chứng minh trước đó rằng *K. pneumoniae* có khả năng sinh trưởng kỵ khí khi có mặt glyxerol (Menzel et al., *J. Biotechnol.* 56:135-142 (1997); Menzel et al., *Biotechnol. Bioeng.* 60:617-626 (1998)). Cũng đã được chứng minh rằng hai đột biến ở gen *lpdA* gen thuộc operon của *E. coli* sẽ làm tăng khả năng sinh trưởng kỵ khí của vi khuẩn này (Kim et al.. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1766-1771 (2007); Kim et al., *J. Bacteriol.* 190:3851-3858 (2008)). Gen *lpdA* của *K. pneumonia* được khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN bộ gen (ATCC700721D) làm khuôn và các mồi KP-lpdA-Bam (5'-acacgcggatccaacgtcccgg-3') (SEQ ID NO:) và KP-lpdA-Nhe (5'-agcggctccgctagccgcttatg-3') (SEQ ID NO:). Đoạn thu được đã được tách dòng vào vectơ pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen; Carlsbad CA), tạo ra plasmit pCR-KP-lpdA.

Việc thay thế gen nhiễm sắc thể đã được thực hiện sử dụng plasmit không tái bản và gen *sacB* từ *Bacillus subtilis* theo phương thức đếm chọn lọc (Gay et al., *J. Bacteriol.* 1,53:1424-1431 (1983)). Vectơ được sử dụng là pRE118 (ATCC87693) đã loại bỏ các trình tự oriT và IS, có kích thước 3,6 kb và mang gen kháng kanamyxin. Trình tự này đã được xác nhận và vectơ được đặt tên là pRE118-V2 (tham khảo, Fig.34).

Các đoạn kết thúc gen *lpdA* của được khuếch đại bằng PCR sử dụng hỗn hợp các mồi: EC-aceF-Pst (5'-aagccgttgctgcagctcttgagc-3') (SEQ ID NO:) + EC-aceF-Bam2 (5'-atctccggcggtcggatccgtcg-3') (SEQ ID NO:) và EC-yacH-Nhe (5'-aaagcggctagccacgccgc-3') (SEQ ID NO:) + EC-yacH-Kpn (5'-attacacgaggtacccaacg-3') (SEQ ID NO:). Đoạn BamHI-XbaI chứa gen *lpdA* của *K. pneumonia* được phân lập từ plasmit pCR-KP-lpdA và sau đó được nối với các đoạn nêu trên của *E. coli* được phân cắt tương ứng bởi PstI +BamHI và NheI-KpnI và plasmit pRE118-V2 được phân cắt bởi KpnI và PstI. Plasmit thu được (được đặt tên là pRE118-M2.1 lpdA yac) đã được trải qua quá trình gây đột biến điểm định hướng (Site Directed Mutagensis-SDM) sử dụng hỗn hợp các mồi KP-lpdA-HisTyr-F (5'- atgctggcgtacaaaggtgtcc-3') (SEQ ID NO:) và (5'-ggacacctttgtacgccagcat-3') (SEQ ID NO:) cho đột biến của gốc His 322 thành gốc Tyr hoặc các mồi KP-lpdA-GluLys-F (5'-atcgcctacactaaaccagaagtgg-3') (SEQ ID NO:) và KP-lpdA-GluLys-R (5'-ccacttctggtttagtgtaggcgat-3') (SEQ ID NO:) cho đột biến của gốc Glu 354 thành gốc Lys.

Phản ứng PCR đã được thực hiện với polymeaza Pfu Turbo (Stratagen; San Diego CA). Trình tự của toàn bộ đoạn này của như sự có mặt của chỉ các đột biến mong muốn đã được kiểm chứng. Plasmit thu được đã được chèn vào các tế bào có khả năng xung điện của *E. coli* ΔadhE::Frt-ΔldhA::Frt bằng quá trình biến nạp. Trường hợp tích hợp đầu tiên ở nhiễm sắc thể được chọn từ các đĩa agar LB chứa Kanamyxin (25 hoặc 50 mg/L). Các đoạn chèn chính xác đã được kiểm chứng bằng PCR sử dụng 2 mồi, một được định vị bên ngoài vùng chèn và một ở gen kanamyxin (5'-aggcagttccataggatggc-3') (SEQ ID NO:). Các dòng tế bào có đoạn chèn chính xác được chọn để phân tích. Các dòng tế bào này được tái nuôi cấy hai lần trên môi trưởng lỏng LB thông thường ở nhiệt độ và các độ pha loãng liên tiếp mong muốn đã được đổ trên các đĩa chứa môi trường không phải LB chứa 10% muối-sucroza. Các dòng tế bào sinh trưởng trên các đĩa chứa sucroza này được sàng lọc cho sự thiếu hụt của gen kháng kanamyxin trên môi trường agar muối thấp LB và sự thay thế gen *lpdA* đã được kiểm chứng bằng PCR và giải trình tự của vùng được bao gồm. Trình tự của vùng chèn đã được kiểm chứng và như được mô tả dưới đây. Một dòng tế bào (có danh pháp 4-4-P1) với đột biến Glu354Lys đã được chọn. Sau đó, dòng tế bào này được tải nạp bằng dịch phân giải P1 của *E. coli* ΔPflB::Frt tạo ra chủng ECKh-138 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322).

Trình tự của vùng ECKh-138 bao gồm các gen *aceF* và L*pdA* được thể hiện trên Fig.35. Gen *lpdA* của *K. pneumonia* được gạch chân và bộ ba mã hóa được gây đột biến ở đột biến Glu354Lys được in bóng. Sự so sánh về trình tự protein của gen *lpdA* của *E. coli* tự nhiên và đột biến *lpdA* của *K. pneumonia* được thể hiện trên Fig.36,

Để đánh giá hiệu quả của việc sử dụng gen *lpdA* của *K. pneumoniae* ở chủng sinh tổng hợp 1,4-butandiol, các chủng vi sinh vật chủ AB3 và ECKh-138 được biến nạp với các plasmit biểu hiện toàn bộ quá trình sản sinh BDO từ các trình tự khởi dầu có thể cảm ứng, bền. Đặc biệt là, gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis* đã được biểu hiện trên plasmit bản sao trung bình pZA33 và gen *Cat2* của *P. gingivalis* và gen *AdhE2* của *C. acetobutylicum* đã được biểu hiện trên plasmit bản sao cao pZE13. Các plasmit này đã được mô tả trong tài liệu chuyên ngành (Lutz and H. Bujard, Nucleic Axits Res 25:1203-1210 (1997)) và việc sử dụng các plasmit này để biểu hiện quá trình sản sinh BDO được mô tả trong Ví dụ 13 và WO2008/115840.

Các tế bào được sinh trưởng kỵ khí ở nhiệt độ 37°C trên môi trường tối thiểu M9 (6,78g/L Na_2HPO_4, 3,0g/L KH_2PO_4, 0,5g/L NaCl, 1,0g/L NH_4Cl, 1mM $MgSO_4$, 0,1mM $CaCl_2$) được bổ sung 20g/L glucoza, 100mM axit 3-(N-morpholino)propansulfonic (MOPS) để cải thiện dung lượng đệm, 10 µg/mL thiamin và các kháng sinh thích hợp. Ban đầu, các điều kiện vi hiếu khí được tạo ra bằng cách sục khí nitơ vào các bình nuôi cấy kỵ khí được bịt kín trong 5 phút, sau đó xuyên qua thành bình nuôi cấy bằng kim 23G sau khi cấy chuyển. Kim này được giữ trong bình nuôi cấy trong quá trình phát triển của vi sinh vật cho phép lượng nhỏ không khí thâm nhập vào các bình này. 0,25mM IPTG được bổ sung vào khi mật độ quang ở bước sóng 600nm (OD600) đạt được xấp xỉ 0,2 để tạo ra các gen quá trình và các mẫu được lấy ra để phân tích mỗi 24 giờ sau cảm ứng. Các dịch nổi tế bào được phân tích đối với1,4-butandiol, 4-hydroxybutyrat và các sản phẩm phụ khác như được mô tả trong Ví dụ 2 và WO2008/115840, quá trình sản sinh BDO và 4-hydroxybutyrat ở chủng ECKh-138 là cao hơn đáng kể sau 48 giờ so với chủng AB3 hoặc chủng vi sinh vật chủ được sử dụng trước đó, MG1655 ΔldhA (Fig.37).

Thay thế trình tự khởi đầu PDH.

Đã được chứng minh trước đó rằng việc thay thế gen ức chế pdhR bằng gen dung hợp có chức năng dịch mã chứa vị trí liên kết Fnr, một trong số các trình tự khởi đầu *pflB* và vị trí liên kết ribosom của nó (RBS), do đó dẫn đến biểu hiện operon aceEF-lpd bởi trình tự khởi đầu kỵ khí, do đó tăng hoạt tính PDH kỵ khí (Zhou et al., *Biotechnol. Lett.* 30:335-342 (2008)). Gen dung hợp chứa vị trí liên kết Fnr, trình tự khởi đầu pflB-p6 và Vị trí liên kết ribosom được tạo cấu trúc bằng phương pháp PCR lồng. Hai đoạn này được khuếch đại, một đoạn sử dụng các mồi aceE-upstream-RC (5'-tgacatgtaacacctaccttctgtgcctgtgccagtggttgctgtgatatagaag-3') (SEQ ID NO:) và pflBp6-Up-Nde (5'- ataataatacatatgaaccatgcgagttacgggcctataagccaggcg-3') (SEQ ID NO:) và the other sử dụng các mồi aceE-EcoRV-EC (5'- agtttttcgatatctgcatcagacaccggcacattgaaacgg-3') (SEQ ID NO:) và aceE-upstream (5'-ctggcacaggcacagaaggtaggtgttacatgtcagaacgtttacacaatgacgtggatc-3') (SEQ ID NO:). Đoạn tw được lắp ráp bằng phản ứng PCR lồng và đoạn ADN cuối cùng được phân cắt bằng các enzym cắt hạn chế NdeI và BamHI. Sau đó, đoạn này được chèn đoạn phía trên của gen aceE thuộc operon của *E. coli* sử dụng vectơ pRE118-V2 như được mô tả nêu trên. Quá trình thay thế được thực hiện ở các chủng ECKh-138 và ECKh-422. Trình tự nucleotit chứa đầu 5' của gen *aceE* đã được kiểm chứng và thể hiện trên Fig.37. Fig.37 thể hiện

trình tự nuleotit đầu 5' của gen *aceE* được dung hợp với trình tự khởi đầu pflB-p6 và vị trí liên kết ribosom (RBS). Trình tự đầu 5' được in nghiêng thể hiện trình tự khởi đầu của gen *aroP*, mà được phiên mã theo chiều ngược lại từ operon, mà được phiên mã theo chiều ngược lại từ operon *pdh*. Trình tự đầu 3' được in nghiêng thể hiện trình tự khởi đầu của gen *aceE*. In hoa: pflB RBS. Được gạch chân: vị trí liên kết FNR. In đậm: trình tự khởi đầu pflB-p6.

Thay thế trình tự khởi đầu ldpA

The promoter region chứa vị trí liên kết fnr, trình tự khởi đầu pflB-p6 and the RBS of the *pflB* gen được khuếch đại bằng PCR sử dụng khuôn ADN nhiễm sắc thể và các mồi aceF-pflBp6-fwd (5'- agacaaatcggttgccgtttgttaagccaggcgagatatgatctatatc-3') (SEQ ID NO:) và lpdA-RBS-B-rev (5'-gagttttgatttcagtactcatcatgtaacacctaccttcttgctgtgatatag-3') (SEQ ID NO:). Plasmit 2-4a được khuếch đại bằng PCR sử dụng các mồi B-RBS-lpdA fwd (5'- ctatatcacagcaagaaggtaggtgttacatgatgagtactgaaatcaaaactc-3') (SEQ ID NO:) và pflBp6-aceF-rev (5'- gatatagatcatatctcgcctggcttaacaaacggcaaccgatttgtct-3') (SEQ ID NO:). Hai đoạn thu được được sắp xếp bằng cách sử dụng kít tách dòng BPS cloning kit (BPS Bioscience; San Diego CA). Cấu trúc thu được kiểm chứng trình tự và chèn vào chủng ECKh-439 sử dụng phương pháp pRE118-V2 được mô tả nêu trên. Trình tự nucleotit chứa vùng *aceF-lpdA* ở chủng thu được ECKh-456 được thể hiện trên Fig.39.

Chủng vi sinh vật chủ ECKh-439 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L ackA fimD:: gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis* fimD:: gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hdb* của *C. kluyveri*), quá trình tạo ra chủng vi sinh vật được mô tả dưới đây và việc thay thế trình tự khởi đầu *pdhR* và *ldpA* của các chủng phát sinh ECKh-455 và ECKh-456, được thử nghiệm để sinh tổng hợp 1,4-butandiol. Các chủng được biến nạp bằng pZS*13 chứa gen *Cat2* của *P. gingivalis* và gen *Ald* của *C. beijerinckii* để thu được quá trình sản sinh BDO hoàn chỉnh. Nuôi cấy các tế bào trên môi trường tối thiểu M9 được bổ sung với 20g/L glucoza như được mô tả nêu trên. 48 giờ sau khi cảm ứng bằng 0,2mM IPTG, nồng độ của 1,4-butandiol, 4-hydroxybutyrat và pyruvat như được thể hiện trên Fig.40. Các chủng thay thế trình tự khởi đầu sinh tổng hợp 1,4-butandiol nhiều hơn không đáng kể so với chủng gốc có cùng nguồn gốc.

Các kết quả này chứng minh rằng quá trình biểu hiện pyruvat dehydrogenaza làm tăng sinh tổng hợp 1,4-butandiol ở các chủng sinh tổng hợp 1,4-butandiol.

Ví dụ 15

Chủng vi sinh vật sản sinh 1,4-butandiol biểu hiện xitrat syntaza và aconitaza

Ví dụ này mô tả việc tăng hoạt tính của xitrat syntaza và aconitaza để tăng quá trình sản sinh BDO. Đột biến R163L với *gltA* được tìm thấy để cải thiện quá trình sản sinh BDO. Ngoài ra, đột biến loại bỏ *arcA* được sử dụng để cải thiện quá trình sản sinh BDO.

Theo tính toán, được xác định rằng chu trình thông qua xitrat syntaza (CS) và aconitaza (ACONT) là cần thiết để đạt được hiệu suất lý thuyết tối đa của 1,4-butandiol (cũng tham khảo WO2008/115840, WO 2009/023493, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0075351). Việc thiếu hụt hoạt tính xitrat syntaza (CS) và aconitaza (ACONT) sẽ làm giảm hiệu suất lý thuyết tối đa xuống 14% trong các điều kiện kỵ khí. Với sự có mặt của chất nhận điện tử bên ngoài, hiệu suất tối đa bị giảm xuống 9% hoặc 6% mà chu trình không thông qua xitrat syntaza (CS) và aconitaza (ACONT) giả định tương ứng là vắng mặt hoặc có mặt hoạt tính PEPCK. Đối với pyruvat dehydrogenaza (PDH), quan trọng là xitrat syntaza (CS) và aconitaza (ACONT) được khuếch đại rất nhiều ở chủng gốc được loại bỏ gen trong đó ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH và PFLi được loại bỏ (thiết kế #439) (tham khảo, WO 2009/023493 và Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, được kết hợp trong sáng chế để tham khảo).

Thiết kế chủng OptKnock chủng tối thiểu được mô tả trong WO 2009/023493 và Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719 có một đột biến loại bỏ bổ sung ngoại trừ ECKh-138, gen *mdh*, mã hóa malat dehydrogenaza. Việc loại bỏ gen này nhằm mục đích ngăn ngừa chu trình thành suxinat thông qua chu trình khử TCA. Việc loại bỏ gen *mdh* đã được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp tương đồng đỏ λ (Datsenko and Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-664,5 (2000)). Các oligonucleotit sau được sử dụng để khuếch đại PCR gen kháng chloramphenicol (CAT) được kết thúc bằng các vị trí FRT từ pKD3:

S-mdh-Kan 5' - **TAT TGT GCA TAC AGA TGA ATT TTT ATG CAA ACA GTC AGC CCT GAA GAA GG**G TGT AGG CTG GAG CTG CTT C - 3' (SEQ ID NO:)

AS-mdh-Kan 5' - **CAA AAA ACC GGA GTC TGT GCT CCG GTT TTT TAT TAT CCG CTA ATC AAT TAC** ATA TGA ATA TCC TCC TTA G - 3' (SEQ ID NO").

Các vùng được gạch chân cho thấy độ tương đồng với plasmit pKD3 và trình tự được in đậm là để chỉ trình tự tương đồng phía trên và phía dưới của *mdh* ORF. Sau khi tinh chế, sản phẩm PCR được gây xung điện vào các tế bào có khả năng tạo xung điện ECKh-138 đã được tải nạp bằng pRedET (tet) và điều chế theo hướng dẫn của nhà sản xuất (www.genbridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf). Sản phẩm PCR được thiết kế sao cho sản phẩm này được liên hợp vào bộ gen của ECKh-138 ở vùng phía trên của gen *mdh*, như được thể hiện trên Fig.41.

Các chủng tái tổ hợp được chọn để kháng chloramphenicol được tinh chế dưới dạng lớp mỏng. Việc loại bỏ gen *mdh* và chèn gen CAT đã được kiểm chứng bằng PCR chẩn đoán. Để loại bỏ gen CAT, plasmit pCP20 nhạy với nhiệt độ chứa FLP recombinaza (Datsenko and Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-6645 (2000)) được biến nạp vào tế bào ở nhiệt độ 30°C và được chọn để kháng ampixilin (AMP). Các chủng biến nạp được sinh trưởng không chọn lọc ở nhiệt độ 42°C qua đêm để tổng hợp FLP cảm ứng nhiệt và gây ra việc loại bỏ plasmit. Sau đó, chủng này được tinh chế dưới dạng lớp mỏng và các khuẩn lạc riêng rẽ được thử nghiệm về sự loại bỏ của tất cả các gen kháng kháng sinh. Phần lớn việc loại bỏ gen kháng kháng sinh được kết thúc bằng FRT và plasmit hỗ trợ FLP diễn ra đồng thời. Quá trình này cũng được biết đến là "trình tự còn lại FRT". Chủng thu được được đặt danh pháp là ECKh-172.

Xitrat syntaza (CS) và aconitaza (ACONT) không có hoạt tính mạnh hoặc được biểu hiện nhiều trong các điều kiện kỵ khí. Để đạt được mục tiêu này, gen arcA, mã hóa cho tác nhân điều hòa toàn chung của chu trình TCA, đã được loại bỏ. Gen arcA hoạt động trong các điều kiện vi hiếu khí để tạo ra quá trình biểu hiện của các sản phẩm gen mà cho phép hoạt tính của các enzym chuyển hóa chủ yếu mà nhạy với nồng độ oxi thấp, *aceE, pflB* và *adhE*. Đã được chứng minh rằng trong điều kiện vi hiếu khí, việc loại bỏ gen *arcA/arcB* làm tăng hoạt tính đặc hiệu của các gen *ldh, icd, gltA, mdh* và *gdh* (Salmon et al., *J. Biol. Chem.* 280:15084-15096 (2005); Shalel-Levanon et al., *Biotechnol. Bioeng.* 92(2):147159 (2005). Các vùng phía trên và phía dưới của gen arcA of *E. coli* MG1655 được khuếch đại bằng PCR sử dụng các mồi tương ứng là, ArcA-up-EcoRI (5'-

ataataatagaattcgtttgctacctaaattgccaactaaatcgaaacagg -3') (SEQ ID NO:) with ArcA-up-KpnI (5'-tattattatggtaccaatatcatgcagcaaacggtgcaacattgccg -3') (SEQ ID NO:) và ArcA-down-EcoRI (5'-tgatctggaagaattcatcggctttaccaccgtcaaaaaaaacggcg -3') (SEQ ID NO:) with ArcA-down-PstI (5'-ataaaaccctgcagcggaaacgaagttttatccatttttggttacctg -3') (SEQ ID NO:). Sau đó, các đoạn này được phân cắt bằng các enzym cắt hạn chế EcoRI và KpnI (đoạn phía trên) và EcoRI và PstI (đoạn phía dưới). Tiếp đó, các đoạn này được nối vào plasmit pRE118-V2 đã được phân cắt bằng PstI và KpnI, tạo ra plasmit pRE118-ΔarcA. Trình tự của plasmit pRE118-ΔarcA đã được kiểm chứng. Plasmit pRE118-ΔarcA được chèn vào các tế bào có khả năng tạo xung điện của chủng *E. coli* ECKh-172 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh). Sau khi tích hợp và phân giải trên các đĩa môi trường chứa muối-sucroza không phải LB như được mô tả nêu trên, quá trình loại bỏ gen arcA ở nhiễm sắc thể của chủng ECKh-401 thu được đã được kiểm chứng bằng cách giải trình tự và được thể hiện trên Fig.42.

Gen *gltA* của *E. coli* mã hóa cho xitrat syntaza. Đã được chứng minh trước đó rằng, gen này bị ức chế về không gian phân bố bởi NADH và các axit amin tham gia vào quá trình ức chế này đã được xác định (Pereira et al., *J. Biol. Chem.* 269(1):412-417 (1994); Stokell et al., *J. Biol. Chem.* 278(37):35435-35443 (2003)). Gen *gltA* của *E. coli* MG1655 được khuếch đại bằng PCR sử dụng các mồi gltA-up (5'-ggaagagaggctggtacccagaagccacagcagga-3') (SEQ ID NO:) và gltA-PstI (5'-gtaatcactgcgtaagcgccatgccccggcgttaattc -3') (SEQ ID NO:). Đoạn được khuếch đại đã được tách dòng vào pRE118-V2 sau khi phân cắt bằng KpnI và PstI. Plasmit thu được được đặt danh pháp là pRE118-gltA. Sau đó, plasmit này được trải qua quá trình gây đột biến điểm định hướng (SDM) sử dụng các mồi R163L-f (5'- attgccgcgttcctcctgctgtcga-3') (SEQ ID NO:) và R163L-r (5'-cgacagcaggaggaacgcggcaat -3') (SEQ ID NO:) để gây đột biến gốc Arg 163 thành gốc Lys. Trình tự của toàn bộ đoạn này được kiểm chứng bằng cách giải trình tự. Biến thể của phương pháp tái tổ hợp tương đồng đỏ λ (Datsenko and Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-664,5 (2000)) được sử dụng để thay thế gen *gltA* bằng đột biến alen R163L mà không để lại trình tự thừa Frt. Nói chung, quy trình tái tổ hợp là tương tự khi được sử dụng để tạo ra sự loại bỏ gen *mdh* đã được mô tả nêu trên. Trước tiên, chủng ECKh-172 được tạo tính kháng streptomyxin bằng cách chèn đột biến trống *rpsL* sử dụng phương pháp tái tổ hợp tương đồng đỏ λ. Tiếp đó, quá trình tái tổ hợp được thực hiện để thay thế toàn bộ vùng mã hóa *gltA* của chủng tự nhiên ở chủng này

bằng catxet chứa gen kháng kanamyxin (kanR) và bản sao của gen *rpsL* của *E. coli* hoang dại. Khi được chèn vào chủng *E. coli* mang đột biến trống *rpsL*, catxet này làm cho các tế bào được gây đột biến từ kháng streptomyxin thành nhạy với streptomyxin. Sau đó, đoạn ADN đã được chèn mà bao gồm mỗi phiên bản đột biến của gen *gltA* cùng với trình tự kết thúc tương đồng thích hợp và khuẩn lạc sinh trưởng thu được được thử nghiệm với sự có mặt của streptomyxin. Thử nghiệm này đã chọn lọc đối với các chủng trong đó kanR/rpsL catxet đã được thay thế bằng gen đột biến *gltA*. Quá trình chèn gen đột biến ở ổ gen chính xác đã được kiểm chứng bằng các phân tích PCR và giải trình tự ADN. Chủng thu được được đặt danh pháp là ECKh-422 và có kiểu gen ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L. Vùng chứa gen *gltA* đã được gây đột biến của chủng ECKh-422 được kiểm chứng bằng cách giải trình tự, như được thể hiện trên Fig.43.

Sau đó, các dịch chiết thô của các chủng ECKh-401 và đột biến gltAR163L của chủng ECKh-422 được đánh giá về hoạt tính xitrat syntaza. Thu lấy các tế bào bằng cách ly tâm ở tốc độ 4500 vòng/phút (Beckman-Coulter, Allegera X-15R; Fullerton CA) trong 10 phút. Các hạt tế bào được tạo hỗn dịch trong 0,3 mL thuốc thử BugBuster (Novagen/EMD; San Diego CA) chứa benzonaza và lysozym và quá trình phân giải được thực hiện trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc nhẹ. Thu lấy dịch phân giải không chứa tế bào bằng cách ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút (Eppendorf centrifuge 5402; Hamburg Germany) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Protein tế bào trong mẫu được xác định bằng cách sử dụng phương pháp của Bradford (Bradford, *Anal. Biochem.* 72:248-254 (1976)).

Hoạt tính xitrat syntaza được xác định bằng cách kiểm soát quá trình hình thành của coenzym A tự do (HS-CoA), mà được giải phóng từ phản ứng của axetyl-CoA với oxaloaxetat. Nhóm thiol tự do của HS-CoA phản ứng với 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic axit) (DTNB) để tạo thành axit 5-thio-2-nitrobenzoic (TNB). Sau đó, nồng độ axit 5-thio-2-nitrobenzoic được kiểm soát theo phương pháp quang phổ bằng cách xác định độ hấp thụ ở bước sóng 410nmm (cực đại ở bước sóng 412nm). Hỗn hợp thử nghiệm chứa 100mM đệm Tris/HCl (pH 7,5), 20mM axetyl-CoA, 10mM DTNB và 20mM oxaloaxetat. Để đánh giá quá trình ức chế NADH, 0,4mM NADH cũng được bổ sung vào phản ứng. Thử nghiệm được bắt đầu bằng cách bổ sung 5 microlit dịch chiết tế bào và tốc độ phản ứng được xác định băng cách theo dõi sự thay đổi độ hấp thụ theo thời gian. Đơn vị hoạt

tính đặc hiệu được định nghĩa là số µmol sản phẩm được biến đổi mỗi phút trên mỗi mg protein.

Fig.44 thể hiện hoạt tính xitrat syntaza của sản phẩm gen *gltA* hoang dại và đột biến R163L. Thử nghiệm này đã được thực hiện với sự vắng mặt hoặc có mặt 0,4mM NADH.

Các chủng ECKh-401 và ECKh-422 được biến nạp với các plasmit biểu hiện toàn bộ quá trình sản sinh BDO. Gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis* và gen *sucA* của *M. bovis* đã được biểu hiện trên plasmit bản sao thấp pZS*13 và gen *Cat2* của *P. gingivalis* và gen *AdhE2* của *C. acetobutylicum* đã được biểu hiện trên plasmit bản sao trung bình pZE23. Các chủng phát sinh của các chủng này được sinh trưởng vi hiếu khí trên môi trường tối thiểu M9 được bổ sung với 20g/L glucoza và các kháng sinh thích hợp như được mô tả nêu trên. Nồng độ 4-hydrobutyrat và 1,4-butandiol ở 48 giờ sau cảm ứng được lấy trung bình từ các chủng bản sao được thể hiện trên Fig.45. Nồng độc của cả hai hợp chất này ở chủng ECKh-422 là cao hơn ở chủng ECKh-401, chứng tỏa rằng hoạt tính của xitrat syntaza đã được cải thiện do quá trình đột biến *gltA* dẫn đến làm tăng chu trình theo quá trình sản sinh BDO.

Các đột biến chủng vi sinh vật chủ được mô tả trong phần này nhằm mục đích để to redirect cacbon chu trình thông qua chu trình oxi hóa TCA, mà phù hợp với thiết kế chủng OptKnock được mô tả trong WO 2009/023493 và Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, Để chứng minh rằng chu trình đã thực sự diễn ra thông qua quá trình này, phân tích chu trình ^{13}C đã được thực hiện bằng cách sử dụng chủng ECKh-432, là phiên bản của ECKh-422 trong đó quá trình ngược chiều được liên hợp vào nhiễm sắc thể (như được mô tả trong Ví dụ 17). Để hoàn thành quá trình sản sinh BDO, gen *Cat2* của *P. gingivalis* và gen *Ald* của *C. beijerinckii* đã được biểu hiện vào pZS*13. Bốn chủng song song này được nuôi cấy trên môi trường tối thiểu M9 (6,78g/L Na_2HPO_4, 3,0g/L KH_2PO_4, 0,5g/L NaCl, 1,0g/L NH_4Cl, 1mM $MgSO_4$, 0,1mM $CaCl_2$) chứa 4g/L glucoza tổng số theo bốn tỷ lệ đánh dấu đồng vị khác nhau ($^{1\text{-}13}C$, chỉ nguyên tử cacbon đầu tiên trong phân tử glucoza được đánh dấu đồng vị bằng ^{13}C; đồng nhất-^{13}C, tất cả các nguyên tử cacbon là ^{13}C):

1. 80mol% không được đánh dấu đồng vị, 20mol% đồng nhất-^{13}C
2. 10mol% không được đánh dấu đồng vị, 90mol% đồng nhất-^{13}C
3. 90mol% $^{1\text{-}13}C$, 10mol% đồng nhất-^{13}C
4. 40mol% $^{1\text{-}13}C$, 60mol% đồng nhất-^{13}C

Các chủng không được đánh dấu đồng vị song song được sinh trưởng ở bản sao, ở đó các mẫu thường xuyên được lấy ra để đánh giá tốc độ sinh trưởng, tốc độ hấp thu glucoza và tốc độ tạo thành sản phẩm. Ở cuối pha sinh trưởng logarit, thu lấy các chủng được đánh dấu đồng vị, protein được phân lập và thủy phân thành các axit amin và quá trình phân bố đánh dấu của các axit amin được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GCMS) như được mô tả trước đó (Fischer and Sauer, *Eur. J. Biochem.* 270:880-891 (2003)). Ngoài ra, quá trình phân bố đánh dấu của 4-hydroxybutyrat và 1,4-butandiol được tiết ra trong canh trường nuôi cấy từ các chủng được đánh dấu được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GCMS) như được mô tả trong WO2008115840, Dữ liệu này được sử dụng để tính toán phân bố chu trình bên trong tế bào bằng cách sử dụng các phương pháp đã được thiết lập (Suthers et al., *Metab. Eng.* 9:387-405 (2007)). Các dòng chuyển hóa chủ yếu thu được và với khoảng tin cậy 95% được thể hiện trên Fig.46. Các trị số này là các thông lượng mol được chuẩn hóa với tốc độ hấp thu glucoza là 1mMoL/giờ. Kết quả cho thấy rằng thông lượng cacbon được định hướng thông qua xitrat syntaza theo hướng oxi hóa và hầu hết các nguyên tửu cacbon tham gia vào quá trình sản sinh BDO hơn là toàn bộ chu trình TCA. Ngoài ra, được khẳng định rằng hầu như không có chu trình giữa malat và oxaloaxetat do sự loại bỏ gen *mdh* ở chủng này.

Ưu điểm của việc sử dụng chủng được loại bỏ gen như các chủng được thiết kế bằng cách sử dụng thuật toán OptKnock để sinh tổng hợp 1,4-butandiol (tham khảo, WO 2009/023493 và Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719) có thể được quan sát bằng cách so sánh các dữ liệu lên men điển hình của chủng ECKh-422 với các dữ liệu lên men của chủng ECKh-138 gốc, trong đó 1,4-butandiol được sinh tổng hợp từ suxinat thông qua chu trình khử TCA (tham khảo, Fig.47). Các quá trình lên men được thực hiện với 1L thể tích nuôi cấy ban đầu trong các thiết bị phản ứng sinh học Biostat B+ dung tích 2L (Sartorius; Cedex France) sử dụng môi trường tối thiểu M9 được bổ sung với 20g/L glucoza. Nhiệt độ được kiểm soát ở 37°C và the pH được kiểm soát ở 7,0 bằng cách sử dụng 2 M NH_4OH hoặc Na_2CO_3. Các tế bào được sinh trưởng hiếu khí đến mật độ quang ở bước sóng 600nm xấp xỉ 10, mà tại thời điểm đó các mồi trường nuôi cấy được cảm ứng bằng 0,2mM IPTG. Một giờ sau khi ủ, tốc độ lưu lượng khí được giảm xuống 0,02 lít trên phút tiêu chuẩn trong các điều kiện vi hiếu khí. Tốc độ khuấy trộn được đặt ở chế độ 700 vòng/phút. Glucoza đậm đặc được nạp vào để duy trì nồng độ glucoza trong bình nuôi cấy nằm trong

khoảng từ 0,5 đến 10g/L. Cả hai chủng này được biến nạp bằng các plasmit chứa toàn bộ quá trình sản sinh BDO, như trong các ví dụ nêu trên. Ở chủng ECKh-138, axetat, pyruvat và 4-hydrobutyrat là các sản phẩm chính của quá trình lên men, trong khi đó với chủng ECKh-422 1,4-butandiol là sản phẩm chính.

Ví dụ 16

Các chủng sinh tổng hợp 1,4-butandiol biểu hiện phosphoenolpyruvat carboxykinaza

Ví dụ này mô tả quá trình sử dụng phosphoenolpyruvat carboxykinaza (PEPCK) để cải thiện quá trình sản sinh BDO. Gen mã hóa cho phosphoenolpyruvat carboxykinaza của *Haemophilus influenza* PEPCK được sử dụng để biểu hiện không tương đồng.

Theo tính toán, đã được chứng minh rằng quá trình biến đổi oxaloaxetat thành phosphoenolpyruvat tạo ra ATP là cần thiết để đạt được hiệu suất lý thuyết tối đa của 1,4-butandiol (cũng tham khảo WO2008/115840, WO 2009/023493, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0047719, Công bố đơn của Mỹ số 2009/0075351). Việc thiếu hoạt tính PEPCK được chứng minh là làm giảm hiệu suất lý thuyết tối đa của 1,4-butandiol xuống 12% trong các điều kiện kỵ khí giả định và 3% do các chất nhận điện tử giả định từ bên ngoài như nitrat hoặc khí oxi có mặt.

Trong các vi sinh vật như *E. coli*, PEPCK hoạt động theo hướng sản sinh glucoza và tiêu thụ ATP từ oxaloaxetat đối với phosphoenolpyruvat. Đã được giả thuyết rằng các hạn chế về mặt động học của PEPCK ở *E. coli* ngăn cản enzym này xúc tác hiệu quả quá trình hình thành của oxaloaxetat từ PEP. PEP carboxylaza (PPC), mà không tạo ra ATP nhưng cần thiết cho quá trình sinh trưởng hiệu quả, được sử dụng một cách tự nhiên bởi *E. coli* để tạo thành oxaloaxetat từ phosphoenolpyruvat. Do đó, ba enzym PEPCK không có nguồn gốc tự nhiên (bảng 26) đã được thử nghiệm về hoạt tính của chúng để bổ sung cho quá trình sinh trưởng của chủng đột biến PPC của *E. coli* trên môi trường tối thiểu glucoza.

Bảng 26. Nguồn trình tự phosphoenolpyruvat carboxykinaza.

Chủng nguồn PEPCK	Số truy cập, Trình tự tham chiếu *GenBank*
Haemophilus influenza	NC_000907,1
Actinobacillus succinogens	YP_001343,536,1
Mannheimia suxiniciproducens	YP_08948,5.1

Các nghiên cứu bổ sung sinh trưởng liên quan đến quá trình biểu hiện của các gen tiềm năng trên cơ sở plasmit ở đột biến Δppc *E.coli* JW3978 thu được từ bộ sưu tập Keio (Baba et al.,molecular Systems Biology 2:2006,0008 (2006)). Các gen được tách dòng phía sau trình tự khởi động PA1lacO-1 ở các vectơ biểu hiện pZA23 (bản sao trung bình) và pZE13 (bản sao cao). Các plasmit này đã được mô tả trước đây (Lutz and Bujard, *Nucleic Axits Res.* 25:1203-1210 (1997)) và việc sử dụng các plasmit này trong quá trình biểu hiện các gen tham gia vào quá trình sản sinh BDO đã được mô tả trước đây trong WO2008115840.

Các chủng nuôi cấy trước đó được sinh trưởng hiếu khí trên môi trường tối thiểu M9 với 4g/L glucoza. Tất cả các chủng nuôi cấy trước đó được bổ sung với aspartat (2mM) để thu được các đột biến Δppc with a source để tạo ra các hợp chất trung gian của chu trình TCA không phụ thuộc quá trình biểu hiện PEPCK. Môi trường tối thiểu M9 cũng được sử dụng trong các điều kiện thử nghiệm với 4g/L glucoza, nhưng aspartat không được bổ sung vào và IPTG được bổ sung vào đến 0,5mM. Bảng 27 thể hiện kết quả của các nghiên cứu bổ sung sinh trưởng.

Bảng 27. Sự bổ sung các đột biến Δppc với PEPCK từ *H. influenzae, A. succinogens* và *M. succinoproducens* khi được biểu hiện từ các vectơ pZA23 hoặc pZE13.

Chủng nguồn PEPCK	**Vectơ**	**Thời gian (giờ)**	**OD_{600}**
H.influenzae	pZA23BB	40	0,950
Δppc Đối chứng	pZA23BB	40	0,038
A.succinogenes	pZA23BB	40	0,055
M. succinoproducenes	pZA23BB	40	0,214
A.succinogens	pZE13BB	40	0,041
M. succinoproducenes	pZE13BB	40	0,024
Δppc Đối chứng	pZE13BB	40	0,042

Gen PEPCK của *Haemophilus influenza* được tìm thấy để bổ sung sinh trưởng ở chủng *E. coli* có đột biến Δppc tốt nhất trong số các gen đã được thử nghiệm về sàng lọc trên cơ sở plasmit. Sau đó gen này được liên hợp vào ổ gen PPC của chủng *E. coli* (MG1655) hoang dại bằng cách sử dụng phương pháp đếm sàng lọc SacB với pRE118-V2 được bộc lộ nêu trên (Gay et al., *J. Bacteriol.* 1,53:1424-1431 (1983)). PEPCK đã được tích hợp giữ lại trình tự khởi đầu PPC tự nhiên của *E. coli*, nhưng sử dụng trình tự kết thúc

PEPCK không có trong tự nhiên. Trình tự của vùng này sau khi thay thế ppc bằng pepck của *H. influenzae* pepck được thể hiện trên Fig.48. Vùng mã hóa pepck được gạch chân.

Các kỹ thuật dùng cho quá trình tiến hóa thích nghi đã được sử dụng để cải thiện tốc độ sinh trưởng của chủng đột biến *E. coli* (Δppc::H. inf pepCK). Môi trường tối thiểu M9 chứa 4g/L glucoza và 50mM natri bicacbonat được sử dụng để nuôi cấy và làm tiến hóa chủng này trong môi trường kỵ khí. Nồng độ natri bicacbonat cao được sử dụng để tạo ra cân bằng với phản ứng PEPCK theo hướng tạo ra oxaloaxetat. Để duy trì pha sinh trưởng logarit, môi trường nuôi cấy được pha loãng 2 lần bất kỳ lúc nào đạt được mật độ quang ở bước sóng 600nm (OD600) là 0,5. Sau khoảng 100 thế hệ qua 3 tuần tiến hóa thích nghi, tốc độ sinh trưởng kỵ khí đã được cải thiện từ khoảng 8 giờ đến tốc độ sinh trưởng kỵ của chủng tự nhiên, khoảng 2 giờ. Sau quá trình tiến hóa, các khuẩn lạc riêng rẽ đã được phân lập và sinh trưởng trong các bình kỵ khí so với quá trình sinh trưởng của chủng tự nhiên và đột biến ban đầu chủng (tham khảo, Fig.49). Môi trường M9 chứa 4g/L glucoza và 50mM natri bicacbonat được sử dụng.

Quá trình thay thế gen ppc/pepck được mô tả nêu trên được lặp lại, tại thời điểm này sử dụng các chủng sinh tổng hợp 1,4-butandiol ECKh-432 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L ΔackA fimD:: gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis* fimD:: gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hdb* của *C. kluyveri*) và ECKh-439 làm các chủng vi sinh vật chủng. Các chủng này chứa chu trình TCA cải tiến được bộc lộ nêu trên cũng như quá trình ngược chiều được tích hợp vào nhiễm sắc thể. Chủng ECKh-439 là chủng phát sinh của ECKh-432 có gen *ackA* đã được loại bỏ, mã hóa cho axetat kinaza. Quá trình loại bỏ này đã được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đếm chọn lọc sacB được mô tả nêu trên.

Chủng phát sinh Δppc::*H. inf* pepCK của ECKh-439, được đặt danh pháp là ECKh-453, was run in a fermentation. Quá trình sản sinh BDO xuôi chiều được hỗ trợ bởi pZS*13 chứa gen *Cat2* của *P. gingivalis* và gen *Ald* của *C. beijerinckii*. Quá trình này đã được thực hiện với 1L thể tích nuôi cấy ban đầu trong các thiết bị phản ứng sinh học Biostat B+ dung tích 2L (Sartorius) sử dụng môi trường tối thiểu M9 được bổ sung với 20g/L glucoza and 50mM $NaHCO_3$. Nhiệt độ được kiểm soát ở 37°C và the pH được kiểm soát ở 7,0 sử dụng 2 M NH_4OH hoặc Na_2CO_3. Các tế bào được sinh trưởng hiếu khí đến mật độ quang ở bước sóng 600nm xấp xỉ 2, mà tại thời điểm đó các môi trường nuôi cấy

được cảm ứng bằng 0,2mM IPTG. Một giờ sau khi ủ, tốc độ lưu lượng khí được giảm xuống 0,01 lít trên phút tiêu chuẩn trong các điều kiện vi hiếu khí. Tốc độ khuấy trộn ban đầu được cài đặt ở chế độ 700 vòng/phút. Tỷ lệ khí tăng dần trong suốt quá trình lên men do mật độ tế bào tăng. Dung dịch glucoza đậm đặc được nạp vào để duy trì nồng độ glucoza trong bình nuôi cấy nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10g/L. Dữ liệu sản phẩm được thể hiện trên Fig.50. Kiểu hình quan sát thấy được, trong đó 1,4-butandiol và axetat được sinh tổng hợp theo tỷ lệ mol xấp xỉ 1:1, rất giống với tỷ lệ mol giữa hai hợp chất này được dự đoán trong WO 2009/023493 đối với thiết kế. #439 (ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi). Mục tiêu loại bỏ phản ứng ASPT được cho là không cần thiết do chu trình tự nhiên thông qua aspartat amoniac-lyaza là thấp.

Nói chung, tính năng quan trọng của các chủng OptKnock đó là quá trình sản sinh chất chuyển hóa quan tâm được liên hợp với quá trình sinh trưởng và hơn thế nữa là quá trình sản sinh sẽ xuất hiện trong pha sinh trưởng logarit cũng như trong pha ổn định. Hiệu quả liên hợp sinh trưởng của chủng ECKh-432 và ECKh-453 được đánh giá bằng cách nuôi cấy trong các bình vi hiếu khí kết hợp lấy mẫu thường xuyên trong pha sinh trưởng logarit. Môi trường M9 chứa 4g/L glucoza và hoặc 10mM $NaHCO_3$ (đối với chủng ECKh-432) hoặc 50mM $NaHCO_3$ (đối với chủng ECKh-453) được sử dụng và 0.2mM IPTG được sử dụng từ lúc gây nhiễm. Các kim 18G được sử dụng để nuôi cấy vi hiếu khí chủng ECKh-432, trong khi đó cả hai kim 18G và 27G được thử nghiệm đối với chủng ECKh-453. Các kim có kích cỡ càng lớn càng tạo ra tạo ra sự thông khí ít hơn. Như được thể hiện trên Fig.51, chủng ECKh-432 không bắt đầu sinh tổng hợp 1,4-butandiol cho tới khi 5g/L glucoza đã được tiêu thụ, tương ứng với giai đoạn đầu của pha ổn định. Chủng ECKh-453 sinh tổng hợp 1,4-butandiol đồng đều hơn trong suốt quá trình thử nghiệm. Ngoài ra, quá trình liên hợp sinh trưởng được cải thiện do sự thông khí của môi trường nuôi cấy giảm.

Ví dụ 17

Quá trình tích hợp các gen tham gia vào quá trình sản sinh BDO ở các vị trí tích hợp đặc hiệu.

Ví dụ này mô tả quá trình tích hợp các gen tham gia vào quá trình sản sinh BDO khác nhau vào ổ gen fimD để thu được quá trình biểu hiện và độ ổn định hiệu quả hơn.

Toàn bộ quá trình sản sinh BDO ngược chiều, tạo ra 4-HB, đã được liên hợp vào nhiễm sắc thể của *E.coli* ở ổ gen fimD. Nhánh suxinat của quá trình ngược chiều được liên hợp vào nhiễm sắc thể của *E.coli* bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp tương đồng đỏ λ (Datsenko and Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-664,5 (2000)). Chủng *E. coli* tiếp nhận là ECKh-422 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L). Đoạn ADN polycistronic chứa trình tự khởi đầu, gen *sucCD*, gen *sucD* và gen *4hbd* và trình tự kết thúc được chèn vào vị trí AflIII của plasmit pKD3. Các mồi sau được sử dụng để khuếch đại operon cùng với gen chỉ thị chloramphenicol từ plasmit. Trình tự được gạch chân là tương đồng với vị trí chèn mục tiêu.

5'-GTTTGCACGCTATAGCTGAGGTTGTTGTCTTCCAGCAACGTACCGTATACAA TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTC-3' (SEQ ID NO:)

5'-
GCTACAGCATGTCACACGATCTCAACGGTCGGATGACCAATCTGGCTGGTAT GGGAATTAGCCATGGTCC-3' (SEQ ID NO:)

Sau khi xử lý DpnI và điện di ADN, sản phẩm PCR tinh chế được sử dụng để biến nạp chủng *E. coli* mang plasmit pKD46. Chủng tiềm năng được chọn từ các đĩa chứa chloramphenicol. ADN bộ gen của chủng tiềm năng được tinh chế. Trình tự chèn được khuếch đại và kiểm chứng bằng cách giải trình tự ADN. Gen chỉ thị kháng chloramphenicol được loại bỏ khỏi nhiễm sắc thể bằng lipaza. Trình tự nuleotit của vùng sau khi chèn và loại bỏ gen chỉ thị được thể hiện trên Fig.52.

Nhánh alpha-ketoglutarat của quá trình ngược chiều được liên hợp vào nhiễm sắc thể bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng. Plasmit được sử dụng trong quá trình đột biến này là thu được từ vectơ pRE118-V2, tham khảo ví dụ 14, mà chứa gen kháng kanamyxin, gen mã hóa levansucraza (sacB) và ori tái bản có điều kiện R6K. Plasmit tích hợp cũng chứa trình tự polycistronic với trình tự khởi đầu, gen *sucA*, gen *4hbd* của *C. kluyveri 4hbd* và trình tự kết thúc được chèn vào giữa hai đoạn ADN 1,5-kb mà tương đồng với các vùng kết thúc của vị trí chèn mục tiêu. Plasmit thu được được sử dụng để biến nạp *E. coli* chủng. Chủng được tích hợp tiềm năng được chọn từ các đĩa chứa kanamyxin. Vị trí tích hợp chính xác được kiểm chứng bằng phương pháp PCR. Để loại bỏ gen chỉ thị kháng sinh khỏi nhiễm sắc thể, các tế bào được chọn để nuôi cấy trên môi trường chứa sucroza. Các chủng cuối cùng được kiểm chứng bằng phương pháp PCR và

giải trình tự ADN. Trình tự nuleotit của vùng nhiễm sắc thể sau khi chèn và loại bỏ gen chỉ thị được thể hiện trên Fig.53.

Chủng tích hợp quá trình ngược chiều thu được ECKh-432 được biến nạp bằng plasmit chứa các gen mã hóa quá trình thu được. Cấu trúc này có khả năng sinh tổng hợp 1,4-butandiol từ glucoza trên môi trường tối thiểu (tham khảo, Fig.54).

Ví dụ 18

Sử dụng hệ thống hấp thu sucroza không phosphotransferaza để giảm sự hình thành sản phẩm phụ pyruvat.

Ví dụ này mô tả quá trình sử dụng hệ thống hấp thu sucroza không phosphotransferaza (PTS) để giảm sự hình thành sản phẩm phụ pyruvat trong quá trình biến đổi sucroza thành 1,4-butandiol.

Các chủng được thiết kế cho quá trình sử dụng sucroza thông qua hệ phosphotransferaza (PTS) sinh tổng hợp lượng pyruvat đáng kể dưới dạng sản phẩm phụ. Do đó, hệ sucroza không-PTS có thể được sử dụng để làm giảm sự hình thành pyruvat do quá trình hấp thu sucroza sẽ không diễn ra đồng thời với quá trình biến đổi phosphoenolpyruvat (PEP) thành pyruvat. Quá trình này sẽ làm tăng nhóm PEP và biến đổi thành oxaloaxetat thông qua PPC hoặc PEPCK.

Qua trình chèn operon mã hóa cho sucroza không-PTS vào vùng *rrnC* đã được thực hiện. Để tạo thành sản phẩm PCR chứa các gen mã hóa cho sucroza không-PTS được kết thúc bằng các vùng tương đồng với vùng rrnC, hai oligo được sử dụng để khuếch đại PCR các gen *csc* từ Mach1™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Chủng này là thế hệ sau của chủng W mà là chủng *E. coli* được biết đến là có khả năng dị hóa sucroza (hoặcencio-Trejo et al., *Biotechnology Biofuels* 1:8 (2008)). Trình tự thu được từ chủng *E. coli* W KO11 (mã truy cập AY314757) (Shukla et al., *Biotechnol. Lett.* 26:689-693 (2004)) và bao gồm các gen mã hóa sucroza permeaza (*cscB*), D-fructokinaza (*cscK*), sucroza hydrolaza (*cscA*) và gen ức chế đặc hiệu sucroza qua LacI (*cscR*). Trước hết, 53 axit amin của *cscR* được loại bỏ hiệu quả bằng trình tự sắp xếp của mồi AS. Trình tự của các oligo là: rrnC 23S del S -CSC 5'-**TGT GAG TGA AAG TCA CCT GCC TTA ATA TCT CAA AAC TCA TCT TCG GGT GA**C GAA ATA TGG CGT GAC TCG ATA C-3' (SEQ ID NO:) và rrnC 23S del AS -CSC 5'-**TCT GTA TCA GGC TGA AAA TCT TCT CTC ATC CGC**

CAA AAC AGC TTC GGC GTT AAG ATG CGC GCT CAA GGA C-3' (SEQ ID NO:). Các đoạn gạch chân chỉ ra trình tự tương đồng với operon *csc* và trình tự in đậm để chỉ trình tự tương đồng xuôi chiều và ngược chiều của vùng *rrnC*. Trình tự của toàn bộ sản phẩm PCR được thể hiện trên Fig.55.

Sau khi tinh chế, sản phẩm PCR được xung điện vào các tế bào có khả năng tạo xung điện MG1655 đã được tải nạp bằng pRedET (tet) và tạo ra theo hướng dẫn của nhà sản xuất

(www.genbridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2,6-2007-screen.pdf). Sản phẩm PCR được thiết kế sao cho nó được liên hợp vào bộ gen ở vùng *rrnC* của nhiễm sắc thể. Vùng này đã xóa bỏ hiệu quả 191 nucleotit xuôi chiều của *rrlC* (23S rRNA), tất cả trong số gen *rrlC* rRNA và 3 nucleotit tạo ra của *rrlC* và thay thế gen này bằng operon mã hóa cho sucroza, như được thể hiện trên Fig.56,

Các chủng biến nạp được sinh trưởng trên môi trường muối tối thiểu M9 với 0,4% sucroza và các khuẩn lạc riêng biệt được thử nghiệm đối với sự có mặt của operon mã hóa cho sucroza bằng phương pháp PCR. Toàn bộ vùng rrnC::crcAKB được biến nạp vào chủng vi sinh vật chủ ECKh-432 sinh tổng hợp 1,4-butandiol bằng tải nạp P1 (Sambrook et al., mol*ecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001), tạo ra chủng ECKh-463 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD *của E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis* fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri* rrnC::cscAKB). Các chủng tái tổ hợp được chọn bằng cách nuôi cấy trên và kiểm chứng bằng phương pháp PCR.

Chủng ECKh-463 được biến nạp bằng pZS*13 chứa gen *Cat2* của *P. gingivalis* và gen *Ald* của *C. beijerinckii* để thu được quá trình sản sinh BDO hoàn chỉnh. Nuôi cấy các tế bào trên môi trường tối thiểu M9 (6,78g/L Na_2HPO_4, 3,0g/L KH_2PO_4, 0,5g/L NaCl, 1,0g/L NH_4Cl, 1mM $MgSO_4$, 0,1mM $CaCl_2$) được bổ sung với 10g/L sucroza. 0,2mM IPTG có mặt trên môi trường nuôi cấy từ đầu. Duy trì các điều kiện kỵ khí bằng cách sử dụng chai với kim 23Ge. Đối với mẫu đối chứng, nuôi cấy chủng ECKh-432 chứa plasmit tương tự trên môi trường tương tự, ngoại trừ 10g/L glucoza thay cho sucroza. Fig.57 thể hiện nồng độ sản phẩm trung bình, được chuẩn hóa với mật độ quang ở bước sóng 600nm

(OD600) của môi trường nuôi cấy, sau 48 giờ sinh trưởng. Dữ liệu thể hiện 6 canh trường nuôi cấy lặp lại của mỗi chủng.

Điều này cho thấy quá trình sản sinh BDO từ chủng ECKh-463 trên sucroza là tương tự với quá trình sản sinh BDO của chủng gốc trên sucroza.

Ví dụ 19

Mô tả các chủng vi sinh vật sản sinh 1,4-butandiol

Ví dụ này mô tả các chủng vi sinh vật khác nhau sinh tổng hợp 1,4-butandiol.

Bảng 28 thể hiện các chủng vi sinh vật khác nhau sinh tổng hợp 1,4-butandiol được bộc lộ trong các ví dụ từ 12 đến 18 nêu trên.

Bảng 28. Các chủng vi sinh vật khác nhau sinh tổng hợp 1,4-butandiol

Chủng vi sinh vật #	**Chủng vi sinh vật chủ #**	**Nhiễm sắc thể của vi sinh vật chủ**	**Đặc điểm vi sinh vật chủ**	**Plasmit-gốc**
1		ΔldhA	Loại bỏ chủng phát sinh đơn của E. coli MG1655	*Gen sucCD của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd, *P. gingivalis* Cat2, *C. acetobutylicum* AdhE2
2	AB3	ΔadhE ΔldhA ΔpflB	Chủng tổng hợp suxinat; chủng phát sinh của E. coli MG1655	*Gen sucCD của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd, *P. gingivalis* Cat2, *C. acetobutylicum* AdhE2
3	ECKh-138	ΔadhE ΔldhA ΔpflB □lpdA::K.p.lpdA322	Cải thiện lpdA để tăng hướng tổng hợp pyruvat dehydrogenaza	*Gen sucCD của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd, *P. gingivalis* Cat2, *C. acetobutylicum* AdhE2
4	ECKh-138	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322		*Gen sucCD của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd, gen *buk1 của C. acetobutylicum, gen ptb của C. acetobutylicum*, *C. acetobutylicum* AdhE2
5	ECKh-401	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA	Loại bỏ mdh và arcA để định hướng tổng hợp thông qua chu trình TCA oxi hóa	*Gen sucCD của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd, *P. gingivalis* Cat2, *C. acetobutylicum* AdhE2
6	ECKh-401	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA		*M. bovis* sucA, *gen sucCD của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd, *P. gingivalis* Cat2, *C.*

Chủng vi sinh vật #	Chủng vi sinh vật chủ #	Nhiễm sắc thể của vi sinh vật chủ	Đặc điểm vi sinh vật chủ	Plasmit-gốc
				acetobutylicum AdhE2
7	ECKh-422	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L	Đột biến ở xitrat syntaza để cải thiện hoạt tính kỵ khí	*Gen sucCD của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd, *P. gingivalis* Cat2, *C. acetobutylicum* AdhE2
8	ECKh-422	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L		*M. bovis* sucA, *gen sucCD của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd, *P. gingivalis* Cat2, *C. acetobutylicum* AdhE2
9	ECKh-422	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L		*M. bovis* sucA, *gen sucCD của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd, *P. gingivalis* Cat2, *C. beijerinckii* Ald
10	ECKh-426	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD *của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd	Nhánh của quá trình sản sinh ngược chiều suxinat được liên hợp vào ECKh-422	*P. gingivalis* Cat2, *C. beijerinckii* Ald
11	ECKh-432	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD *của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri*	Các nhánh của quá trình sản sinh ngược chiều suxinat và alpha-ketoglutarat được liên hợp vào ECKh-422	*P. gingivalis* Cat2, *C. beijerinckii* Ald
12	ECKh-432	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD *của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri*		*Gen buk1 của C. acetobutylicum, gen ptb của C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* Ald
13	ECKh-439	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L ΔackA fimD:: gen sucCD *của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri*	:oại bỏ axetat kinaza của chủng ECKh-432	*P. gingivalis* Cat2, *C. beijerinckii* Ald
14	ECKh-453	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L ΔackA Δppc::H.i.ppck fimD:: gen sucCD *của E. coli*, *P.*	Loại bỏ axetat kinaza và thay thế PPC/PEPCK của chủng ECKh-432	*P. gingivalis* Cat2, *C. beijerinckii* Ald

Chủng vi sinh vật #	Chủng vi sinh vật chủ #	Nhiễm sắc thể của vi sinh vật chủ	Đặc điểm vi sinh vật chủ	Plasmit-gốc
		gingivalis sucD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri*		
15	ECKh-456	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::fnr-pflB6-K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD *của E. coli, P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri*	Thay thế trình tự khởi đầu lpdA bằng trình tự khởi đầu kỵ khí ở ECKh-432	*P. gingivalis* Cat2, *C. beijerinckii* Ald
16	ECKh-455	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 ΔpdhR:: fnr-pflB6 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD *của E. coli, P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri*	Thay thế trình tự khởi đầu pdhR và aceEF bằng trình tự khởi đầu kỵ khí ở ECKh-432	*P. gingivalis* Cat2, *C. beijerinckii* Ald
17	ECKh-459	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD *của E. coli, P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri* fimD:: gen *buk1 của C. acetobutylicum, gen ptb của C. acetobutylicum C. acetobutylicum* ptb	Quá trình liên hợp của BK/PTB vào ECKh-432	*C. beijerinckii* Ald
18	ECKh-459	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD *của E. coli, P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri* fimD:: gen *buk1 của C. acetobutylicum, gen ptb của C. acetobutylicum*		*C. beijerinckii* Ald, *G. thermoglucosidasius adh1*
19	ECKh-463	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD *của E. coli, P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri* rrnC::cscAKB	Các gen không-PTS sucroza được chèn vào ECKh-432	*P. gingivalis* Cat2, *C. beijerinckii* Ald
20	ECKh-463	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh		*Gen buk1 của C. acetobutylicum, gen ptb của C. acetobutylicum, C.*

Chủng vi sinh vật #	Chủng vi sinh vật chủ #	Nhiễm sắc thể của vi sinh vật chủ	Đặc điểm vi sinh vật chủ	Plasmit-gốc
		ΔarcA gltAR163L fimD:: gen sucCD *của E. coli*, *P. gingivalis* sucD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: gen *sucA của M. bovis, gen 4hdb của C. kluyveri* rrnC::cscAKB		*beijerinckii* Ald

Các chủng vi sinh vật được thể hiện trong bảng 28 là như sau. Chủng 1: loại bỏ chủng phát sinh đơn của E. coli MG1655, có loại bỏ *ldhA* ngoại sinh; biểu hiện plasmit thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của P. gingivalis, gen *4hbd* của *P. gingivalis*, gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *AdhE*2 của *C. acetobutylicum*. Chủng 2: Chủng vi sinh vật chủ AB3, chủng này tổng hợp suxinat, chủng phát sinh của *E. coli* MG1655, có loại bỏ *adhE ldhA pflB* ngoại sinh; biểu hiện plasmit thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis*, gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *AdhE2* của *C. acetobutylicum*.

Chủng 3: Chủng vi sinh vật chủ ECKh-138, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA*; biểu hiện plasmit thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis*, gen *Cat2* của *P. gingivalis, gen AdhE2 của C. acetobutylicum*; chủng này đề xuất cải tiến *lpdA* để tăng hướng pyruvat dehydrogenaza. Chủng 4: Chủng vi sinh vật chủ ECKh-138, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh và *lpdA*, chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys; plasmit expression *Gen sucCD của E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis*, gen *buk1* của *C. acetobutylicum*, gen *ptb* của *C. acetobutylicum*, gen *AdhE2* của *C. acetobutylicum*.

Chủng 5: Chủng vi sinh vật chủ ECKh-401, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pfl*B ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh; biểu hiện plasmit thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis*, gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *AdhE2* của *C. acetobutylicum*; chủng này được loại bỏ các gen mdh và arcA để định hướng thông qua chu trình TCA oxi hóa. Chủng 6: chủng vi sinh vật chủ ECKh-401, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn

nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen lpdA, loại bỏ mdh và arcA ngoại sinh; biểu hiện plasmit thuộc gen sucA của M. bovis, gen sucCD của E. coli, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis*, gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *AdhE2* của *C. acetobutylicum*.

Chủng 7: Chủng vi sinh vật chủ ECK-422, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu; biểu hiện plasmit thuộc gen *sucCD* của E. coli, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis*, gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *AdhE2* của *C. acetobutylicum*; chủng này được gây đột biến ở xitrat syntaza để cải thiện hoạt tính kỵ khí. Chủng 8: chủng ECKh-422, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu; biểu hiện plasmit thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis*, gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *AdhE2* của *C. acetobutylicum*. Chủng 9: chủng vi sinh vật chủ ECK-422, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu; biểu hiện plasmit thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis*, gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *Ald* của *C. beijerinckii*.

Chủng 10: chủng vi sinh vật chủ ECkh-426, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen sucCD của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis*; biểu hiện plasmit thuộc gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *Ald* của *C. beijerinckii*; chủng này có nhánh quá trình ngược chiều suxinat được liên hợp vào chủng ECKh-422 ở ổ gen *fimD*. Chủng 11: chủng vi sinh vật chủ ECKh-432, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA*

bằng đột biến gltA Arg163Leu, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis, gen 4hbd* của *P. gingivalis,* chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hbd* của *C. kluyveri*; biểu hiện plasmit thuộc gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *Ald* của *C. beijerinckii*; chủng này có các nhánh quá trình ngược chiều suxinat và alpha-ketoglutarat được liên hợp vào chủng ECKh-422. Chủng 12: chủng vi sinh vật chủ ECKh-432, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen lpdA của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD của P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis,* chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hbd* của *C. kluyveri*; biểu hiện plasmit thuộc gen *buk1* của *C. acetobutylicum*, gen *ptb* của *C. acetobutylicum*, gen *Ald* của *C. beijerinckii.*

Chủng 13: chủng vi sinh vật chủ ECKh-439, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu, loại bỏ *ackA* ngoại sinh, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucCD* của *E. coli, gen sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis,* chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hbd* của *C. kluyveri*; biểu hiện plasmit thuộc gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *Ald* của *C. beijerinckii*; chủng này được loại bỏ axetat kinaza ở chủng ECKh-432. Chủng 14: chủng vi sinh vật chủ ECKh-453, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu, loại bỏ *ackA* ngoại sinh, loại bỏ *ppc* ngoại sinh và chèn *ppck* của *Haemophilus influenza* ở ổ gen ppc, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucCD* của E. coli, gen *sucD* của *P. gingivalis, gen 4hbd* của *P. gingivalis,* chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hbd* của *C. kluyveri*; biểu hiện plasmit thuộc gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *Ald* của *C. beijerinckii*; chủng này được loại bỏ axetat kinaza và thay thế PPC/PEPCK ở chủng ECKh-432.

Chủng 15: chủng vi sinh vật chủ ECKh-456, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm

sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis,* chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hbd* của *C. kluyveri*, thay thế trình tự khởi đầu *lpdA* bằng bị trí liên kết fnr, trình tự khởi đầu pflB và RBS của *pflB*; biểu hiện plasmit thuộc gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *Ald* của *C. beijerinckii*; chủng được thay thế trình tự khởi đầu *lpdA* bằng trình tự khởi đầu kỵ khí ở chủng ECKh-432. Chủng 16: chủng vi sinh vật chủ ECKh-455, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis,* chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hbdI* của *C. kluyveri,* thay thế trình tự khởi đầu *pdhR* và *aceEF* bằng vị trí liên kết fnr, trình tự khởi đầu pflB và RBS của *pflB*; biểu hiện plasmit thuộc gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *Ald* của *C. beijerinckii*; chủng có sự thay thế trình tự khởi đầu pdhR và aceEF bằng trình tự khởi đầu kỵ khí ở ECKh-432.

Chủng 17: chủng vi sinh vật chủ ECKh-459, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis,* chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hbd* của C. *kluyveri*, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *buk1* của *C. acetobutylicum*, gen *ptb* của *C. acetobutylicum*; biểu hiện plasmit thuộc gen *Ald* của *C. beijerinckii*; chủng này có sự liên hợp của BK/PTB vào chủng ECKh-432. Chủng 18: chủng vi sinh vật chủ ECKh-459, loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis,* chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hbd* của *C. kluyveri*, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *buk1* của *C. acetobutylicum*, gen *ptb* của *C. acetobutylicum*; biểu hiện plasmit thuộc gen *Ald* của *C. beijerinckii*, gen *adh1* của *G. thermoglucosidasius*.

Chủng 19: chủng vi sinh vật chủ ECKh-463, loại bỏ *adhE, ldhA, pflB* ngoại sinh, loại bỏ *lpdA* ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen lpdA của Klebsiella pneumoniae bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA,* loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen fimD thuộc gen sucCD của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis,* chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen fimD thuộc gen *sucA* của M. bovis, gen *4hbd* của C. kluyveri, chèn ở ổ gen *rrnC* của các gen không-PTS sucroza operon sucroza permeaza (*cscB*), D-fructokinaza (*cscK*), sucroza hydrolaza (*cscA*) và gen kìm hãm đặc hiệu sucroza liên quan đến LacI (*cscR*); biểu hiện plasmit thuộc gen *Cat2* của *P. gingivalis*, gen *Ald* của *C. beijerinckii*; chủng này có các gen không-PTS sucroza được chèn vào chủng ECKh-432. Chủng 20: chủng vi sinh vật chủ ECKh-463; loại bỏ *adhE*, *ldhA*, *pflB* ngoại sinh, loại bỏ lpdA ngoại sinh và chèn nhiễm sắc thể thuộc gen *lpdA* của *Klebsiella pneumoniae* bằng đột biến Glu354Lys ở ổ gen *lpdA*, loại bỏ *mdh* và *arcA* ngoại sinh, thay thế nhiễm sắc thể của *gltA* bằng đột biến *gltA* Arg163Leu, chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucCD* của *E. coli*, gen *sucD* của *P. gingivalis*, gen *4hbd* của *P. gingivalis,* chèn nhiễm sắc thể ở ổ gen *fimD* thuộc gen *sucA* của *M. bovis*, gen *4hbd* của *C. kluyveri*, chèn ở ổ gen rrnC của không-PTS sucroza operon; biểu hiện plasmit thuộc gen *buk1* của *C. acetobutylicum*, gen *ptb* của *C. acetobutylicum*, gen *Ald* của *C. beijerinckii*.

Ngoài các chủng vi sinh vật sản sinh 1,4-butandiol được bộc lộ trong sáng chế, bao gồm các chủng được thể hiện trong bảng 28, được hiểu rằng các đột biến bổ sung có thể được liên hợp để tiếp tục tăng sinh tổng hợp 1,4-butandiol và/hoặc giảm các sản phẩm phụ không mong muốn. Ví dụ, chủng vi sinh vật sản sinh 1,4-butandiol, hoặc chủng thuộc Bảng 28, có thể liên hợp các gen đột biến loại bỏ để tiếp tục tăng sinh tổng hợp 1,4-butandiol hoặc giảm sản phẩm phụ không mong muốn. Ví dụ về gen đột biến loại bỏ đã được mô tả trước đây (tham khảo đơn công bố của Mỹ số 2009/0047719). Các chủng được loại bỏ gen này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ADHEr, NADH6; ADHEr, PPCK; ADHEr, SUCD4; ADHEr, ATPS4r; ADHEr, FUM; ADHEr, MDH; ADHEr, PFLi, PPCK; ADHEr, PFLi, SUCD4; ADHEr, ACKr, NADH6; ADHEr, NADH6, PFLi; ADHEr, ASPT, MDH; ADHEr, NADH6, PPCK; ADHEr, PPCK, THD2; ADHEr, ATPS4r, PPCK; ADHEr, MDH, THD2; ADHEr, FUM, PFLi; ADHEr, PPCK, SUCD4; ADHEr, GLCpts, PPCK; ADHEr, GLUDy, MDH; ADHEr, GLUDy, PPCK; ADHEr, FUM, PPCK; ADHEr, MDH, PPCK; ADHEr, FUM, GLUDy; ADHEr, FUM, HEX1;

ADHEr, HEX1, PFLi; ADHEr, HEX1, THD2; ADHEr, FRD2, LDH_D, MDH; ADHEr, FRD2, LDH_D, ME2; ADHEr, MDH, PGL, THD2; ADHEr, G6PDHy, MDH, THD2; ADHEr, PFLi, PPCK, THD2; ADHEr, ACKr, AKGD, ATPS4r; ADHEr, GLCpts, PFLi, PPCK; ADHEr, ACKr, ATPS4r, SUCOAS; ADHEr, GLUDy, PFLi, PPCK; ADHEr, ME2, PFLi, SUCD4; ADHEr, GLUDy, PFLi, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4; ADHEr, FUM, HEX1, PFLi; ADHEr, MDH, NADH6, THD2; ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6; ADHEr, ATPS4r, FUM, NADH6; ADHEr, ASPT, MDH, NADH6; ADHEr, ASPT, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, GLUDy, MDH; ADHEr, ATPS4r, MDH, PPCK; ADHEr, ATPS4r, FUM, PPCK; ADHEr, ASPT, GLCpts, MDH; ADHEr, ASPT, GLUDy, MDH; ADHEr, ME2, SUCD4, THD2; ADHEr, FUM, PPCK, THD2; ADHEr, MDH, PPCK, THD2; ADHEr, GLUDy, MDH, THD2; ADHEr, HEX1, PFLi, THD2; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL; ADHEr, ACKr, FRD2, LDH_D; ADHEr, ACKr, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, FUM, GLUDy; ADHEr, ATPS4r, FUM, HEX1; ADHEr, ATPS4r, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGDH; ADHEr, GLCpts, PPCK, THD2; ADHEr, GLUDy, PPCK, THD2; ADHEr, FUM, HEX1, THD2; ADHEr, ATPS4r, ME2, THD2; ADHEr, FUM, ME2, THD2; ADHEr, GLCpts, GLUDy, PPCK; ADHEr, ME2, PGL, THD2; ADHEr, G6PDHy, ME2, THD2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, ME2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, MDH; ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PFLi; ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6, PGL; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, NADH6; ADHEr, ACKr, FUM, GLUDy, LDH_D; ADHEr, ACKr, GLUDy, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL, THD2; ADHEr, ASPT, G6PDHy, MDH, PYK; ADHEr, ASPT, MDH, PGL, PYK; ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, SUCOAS; ADHEr, ASPT, FUM, LDH_D, MDH; ADHEr, ASPT, LDH_D, MALS, MDH; ADHEr, ASPT, ICL, LDH_D, MDH; ADHEr, FRD2, GLUDy, LDH_D, PPCK; ADHEr, FRD2, LDH_D, PPCK, THD2; ADHEr, ACKr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ACKr, ACS, PPC, PPCK; ADHEr, GLUDy, LDH_D, PPC, PPCK; ADHEr, LDH_D, PPC, PPCK, THD2; ADHEr, ASPT, ATPS4r, GLCpts, MDH; ADHEr, G6PDHy, MDH, NADH6, THD2; ADHEr, MDH, NADH6, PGL, THD2; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, GLCpts, MDH; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, MDH, PGL; ADHEr, ACKr, LDH_D, MDH, SUCD4.

Bảng 29 thể hiện các phản ứng của các gen tương ứng bị loại khỏi sinh vật chủ như *E. coli*. Các chất chuyển hóa tương ứng tương ứng với danh pháp viết tắt ở bảng 29 được thể hiện ở bảng 30.

Bảng 29. Các gen tương ứng bị loại để ngăn ngừa phản ứng cụ thể do xuất hiện ở *E. coli*.

Danh pháp viết tắt của phản ứng	Phương trình hợp thức của phản ứng*	Các gen mã hóa các enzym xúc tác mỗi phản ứng
ACKr	[c] : ac + atp <==> actp + adp	(b3115 hoặc b2296 hoặc b1849)
ACS	[c] : ac + atp + coa --> accoa + amp + ppi	b4069
ACt6	ac[p] + h[p] <==> ac[c] + h[c]	Không gen được liên hợp
ADHEr	[c] : etoh + nad <==> acald + h + nadh [c] : acald + coa + nad <==> accoa + h + nadh	(b0356 hoặc b1478 hoặc b1241) (b1241 hoặc b0351)
AKGD	[c] : akg + coa + nad --> co2 + nadh + succoa	(b0116 và b0726 và b0727)
ASNS2	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744
ASPT	[c] : asp-L --> fum + nh4	b4139
ATPS4r	adp[c] + (4) h[p] + pi[c] <==> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	(((b3736 và b3737 và b3738) và (b3731 và b3732 và b3733 và b3734 và b3735)) hoặc ((b3736 và b3737 và b3738) và (b3731 và b3732 và b3733 và b3734 và b3735) và b3739))
CBMK2	[c] : atp + co2 + nh4 <==> adp + cbp + (2) h	(b0521 hoặc b0323 hoặc b2874)
EDA	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850
ENO	[c] : 2pg <==> h2o + pep	b2779
FBA	[c] : fdp <==> dhap + g3p	(b2097 hoặc b2925 hoặc b1773)
FBP	[c] : fdp + h2o --> f6p + pi	(b4232 hoặc b3925)
FDH2	for[p] + (2) h[c] + q8[c] --> co2[c] + h[p] + q8h2[c] for[p] + (2) h[c] + mqn8[c] --> co2[c] + h[p] + mql8[c]	((b3892 và b3893 và b3894) hoặc (b1474 và b1475 và b1476))
FRD2	[c] : fum + mql8 --> mqn8 + succ [c] : 2dmmql8 + fum --> 2dmmq8 + succ	(b4151 và b4152 và b4153 và b4154)
FTHFD	[c] : 10fthf + h2o --> for + h + thf	b1232
FUM	[c] : fum + h2o <==> mal-L	(b1612 hoặc b4122 hoặc b1611)
G5SD	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243
G6PDHy	[c] : g6p + nadp <==> 6pgl + h + nadph	b1852
GLCpts	glc-D[p] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 và b1101 và b2415 và b2416) hoặc (b1817 và b1818 và b1819 và b2415 và b2416) hoặc (b2417 và b1621 và b2415 và b2416))
GLU5K	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	[c] : glu-L + h2o + nadp <==> akg + h + nadph + nh4	b1761
GLYCL	[c] : gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4	(b2904 và b2903 và b2905 và b0116)
HEX1	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388
ICL	[c] : icit --> glx + succ	b4015
LDH_D	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	(b2133 hoặc b1380)
MALS	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	(b4014 hoặc b2976)
MDH	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236
ME2	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463
MTHFC	[c] : h2o + methf <==> 10fthf + h	b0529

Danh pháp viết tắt của phản ứng	Phương trình hợp thức của phản ứng*	Các gen mã hóa các enzym xúc tác mỗi phản ứng
N*ADH1*2	[c] : h + mqn8 + nadh --> mql8 + nad [c] : h + nadh + q8 --> nad + q8h2 [c] : 2dmmq8 + h + nadh --> 2dmmql8 + nad	b1109
NADH6	(4) h[c] + nadh[c] + q8[c] --> (3) h[p] + nad[c] + q8h2[c] (4) h[c] + mqn8[c] + nadh[c] --> (3) h[p] + mql8[c] + nad[c] 2dmmq8[c] + (4) h[c] + nadh[c] --> 2dmmql8[c] + (3) h[p] + nad[c]	(b2276 và b2277 và b2278 và b2279 và b2280 và b2281 và b2282 và b2283 và b2284 và b2285 và b2286 và b2287 và b2288)
PFK	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916 hoặc b1723)
PFLi	[c] : coa + pyr --> accoa + for	(((b0902 và b0903) và b2579) hoặc (b0902 và b0903) hoặc (b0902 và b3114) hoặc (b3951 và b3952))
PGDH	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
PGI	[c] : g6p <==> f6p	b4025
PGL	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767
PGM	[c] : 2pg <==> 3pg	(b3612 hoặc b4395 hoặc b0755)
PPC	[c] : co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956
PPCK	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
PRO1z	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014
PYK	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	b1854 hoặc b1676)
PYRt2	h[p] + pyr[p] <==> h[c] + pyr[c]	Không gen được liên hợp
RPE	[c] : ru5p-D <==> xu5p-D	(b4301 hoặc b3386)
SO4t2	so4[e] <==> so4[p]	(b0241 hoặc b0929 hoặc b1377 hoặc b2215)
SUCD4	[c] : q8 + succ --> fum + q8h2	(b0721 và b0722 và b0723 và b0724)
SUCOAS	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	(b0728 và b0729)
SULabc	atp[c] + h2o[c] + so4[p] --> adp[c] + h[c] + pi[c] + so4[c]	((b2422 và b2425 và b2424 và b2423) hoặc (b0763 và b0764 và b0765) hoặc (b2422 và b2424 và b2423 và b3917))
TAL	[c] : g3p + s7p <==> e4p + f6p	(b2464 hoặc b0008)
THD2	(2) h[p] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 và b1603)
THD5	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962 hoặc (b1602 và b1603))
TPI	[c] : dhap <==> g3p	b3919

Bảng 30. Danh pháp của các chất chuyển hóa tương ứng với danh pháp viết tắt được sử dụng ở bảng 29.

Danh pháp viết tắt của chất chuyển hóa	Danh pháp chất chuyển hóa
10fthf	10-Formyltetrahydrofolat
1pyr,5c	1-Pyrolin-5-carboxylat
2ddg6p	2-Dehydro-3-deoxy-D-gluconat 6-phosphat
2dmmq8	2-Demetylmenaquinon 8
2dmmql8	2-Demetylmenaquinol 8
2pg	D-Glyxerat 2-phosphat
3pg	3-Phospho-D-glyxerat
6pgc	6-Phospho-D-gluconat
6pgl	6-phospho-D-glucono-15-lacton
ac	Axetat
acald	Axetaldehyt
accoa	Axetyl-CoA
actp	Acetyl phosphat
adp	ADP
akg	2-Oxoglutarat
amp	AMP
asn-L	L-Asparagin
asp-L	L-Aspartat
atp	ATP
cbp	Carbamoyl phosphat
co2	CO2
coa	Coenzym A
dhap	Dihydroxyacetone phosphat
e4p	D-Erythrose 4-phosphat
etoh	Etanol
f6p	D-Fructoza 6-phosphat
fad	Flavin adenin dinucleotit bị oxi hóa
fadh2	Flavin adenin dinucleotit bị khử
fdp	D-Fructoza 1,6-bisphosphat
for	Format
fum	Fumarat
g3p	Glyxeraldehyt 3-phosphat
g6p	D-Glucoza 6-phosphat
glc-D	D-Glucoza
glu,5p	L-Glutamat 5-phosphat
glu,5sa	L-Glutamat 5-semialdehyt
glu-L	L-Glutamat
glx	Glyoxylat
gly	Glyxin
h	H^+
h2o	H2O
icit	Isoxitrat
lac-D	D-Lactat
mal-L	L-Malat
methf	5,10-Metenyltetrahydrofolat
mlthf	5,10-Metylentetrahydrofolat
mql8	Menaquinol 8
mqn8	Menaquinon 8
nad	Nicotinamit adenin dinucleotit

Danh pháp viết tắt của chất chuyển hóa	Danh pháp chất chuyển hóa
nadh	Nicotinamit adenin dinucleotit bị khử
nadp	Nicotinamit adenin dinucleotit phosphat
nadph	Nicotinamit adenin dinucleotit phosphat bị khử
nh4	Amoni
oaa	Oxaloaxetat
pep	Phosphoenolpyruvat
pi	Phosphat
ppi	Diphosphat
pro-L	L-Prolin
pyr	Pyruvat
q8	Ubiquinon-8
q8h2	Ubiquinol-8
ru5p-D	D-Ribuloza 5-phosphat
s7p	Sedoheptuloza 7-phosphat
so4	Sulfat
succ	Suxinat
succoa	Suxinyl-CoA
thf	5,6,7,8-Tetrahydrofolat
xu5p-D	D-Xyluloza 5-phosphat

Trong phạm vi đơn sáng chế này, các công bố đơn khác nhau đã được tham khảo. Các bộc lộ của toàn bộ các công bố đơn này được kết hợp trong sáng chế để tham khảo và mô tả đầy đủ hơn tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Mặc dù sáng chế được mô tả cùng với tham chiếu các ví dụ được đề xuất nêu trên, được hiểu rằng các biến đổi khác nhau có thể được tạo ra mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật không có trong tự nhiên, có quá trình sản sinh 1,4-butandiol (BDO) bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sinh tổng hợp BDO, trong đó vi sinh vật này được cải biến di truyền để biểu hiện 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza ngoại sinh, và trong đó vi sinh vật này bao gồm:

(A) quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

sucxinyl-CoA syntetaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA; hoặc

alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA; hoặc

glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza, hoặc butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutanal reductaza; và

(B) trong đó vi sinh vật này bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí; biểu hiện xitrat syntaza ngoại sinh không nhạy NADH; biểu hiện pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh và biểu hiện phosphoenolpyruvat carboxykinaza ngoại sinh.

2. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutanal reductaza.

3. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) sucxinyl-CoA syntetaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutanal reductaza.

4. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutanal reductaza.

5. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutanal reductaza.

6. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutanal reductaza.

7. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) sucxinyl-CoA syntetaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutanal reductaza.

8. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutanal reductaza.

9. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutanal reductaza.

10. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó

a) sucxinyl-CoA syntetaza được mã hóa bởi gen *sucCD* của *Escherichia coli*,

b) alpha-ketoglutarat decarboxylaza nói trên được mã hóa bởi gen *sucA* của *Mycobacterium bovis*,

c) sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc Co, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza và 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza được mã hóa bởi các gen của *Porphyromonas gingivalis* W83,

d) butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza được mã hóa bởi các gen *buk1* và *ptb* của *Clostridium acetobutilicum*,

e) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza được mã hóa bởi gen *ald* của *Clostridium beijerinckii*,

f) 4-hydroxybutanal reductaza được mã hóa bởi gen *adh1* của *Geobacillus thermoglucosidasius*,

g) pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh nói trên được mã hóa bởi gen *lpdA* của *Klebsiella pneumonia*,

h) xitrat syntaza không nhạy NADH nói trên được mã hóa bởi *gltA*,

i) xitrat syntaza không nhạy NADH nói trên được mã hóa bởi thể đột biến R163L của *gltA*, hoặc

j) phosphoenolpyruvat carboxykinaza nói trên được mã hóa bởi gen phosphoenolpyruvat carboxykinaza của *Haemophilus influenza*.

11. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh nói trên không nhạy NADH.

12. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó một hoặc nhiều gen mã hóa tiểu đơn vị pyruvat dehydrogenaza của vi sinh vật này được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu của pyruvat format lyaza.

13. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó đột biến phá vỡ hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp kỵ khí là đột biến phá vỡ gen *arcA*.

14. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó vi sinh vật này còn bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa malat dehydrogenaza.

15. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó một hoặc nhiều gen mã hóa các enzym được biểu hiện ngoại sinh này được liên hợp vào ổ gen *fimD* của sinh vật chủ.

16. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó sinh vật nói trên biểu hiện hệ thống hấp thu sucroza không-phosphotransferaza.

17. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó sinh vật nói trên còn bao gồm đột biến phá vỡ lactat dehydrogenaza, rượu dehydrogenaza và pyruvat format lyaza nội sinh.

18. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó vi sinh vật này là *Escherichia coli.*

19. Phương pháp sản xuất 1,4-butandiol (BDO), trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18 trong các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để tạo ra BDO.

20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tách BDO.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó BDO được tách bằng cách chưng cất.

22. Vi khuẩn không có trong tự nhiên, có quá trình sản sinh 1,4-butandiol (BDO) bao gồm các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sinh tổng hợp BDO, trong đó vi khuẩn này được cải biến di truyền, và trong đó vi khuẩn này:

(A) có quá trình sản sinh BDO được chọn từ:

(i) quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA; hoặc

glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza;

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza; và

(e) 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol;

(ii) quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

sucxinyl-CoA syntetaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) aldehyt dehydrogenaza, aldehyt dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 4-hydroxybutyraldehyt; và rượu dehydrogenaza, rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyraldehyt thành 1,4-butandiol; hoặc

aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol;

(iii) quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

glutamat dehydrogenaza; glutamat decarboxylaza; và 4-aminobutyrat oxidoreductaza khử amin hoặc 4-aminobutyrat transaminaza; hoặc

alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza; và

(c) 4-hydroxybutyrat kinaza; phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza; và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza; 4-hydroxybutanal dehydrogenaza phosphoryl hóa; và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza; phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu; hoặc

4-hydroxybutyryl-CoA transferaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza; 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza; và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyryl-CoA transferaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza; và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu; và

(iv) quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) glutamat CoA transferaza hoặc glutamyl-CoA hydrolaza hoặc glutamyl-CoA ligaza; glutamyl-CoA reductaza; và glutamat-5-semialdehyt reductaza; hoặc

glutamat CoA transferaza hoặc glutamyl-CoA hydrolaza hoặc glutamyl-CoA ligaza; và glutamyl-CoA reductaza tạo ra rượu; hoặc

glutamat 5-kinaza; glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza phosphoryl hóa; và glutamat-5-semialdehyt reductaza;

(b) axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza khử amin hoặc axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza; và

(c) axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza; và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza khử cacboxyl; 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza; và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza khử cacboxyl và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu; và

(B) bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa protein trong hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí; hoặc biểu hiện xitrat syntaza ngoại sinh không nhạy NADH.

23. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó vi sinh vật này biểu hiện phosphoenolpyruvat carboxykinaza ngoại sinh.

24. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó đột biến phá vỡ gen mã hóa protein trong hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí nói trên là đột biến phá vỡ gen *arcA* .

25. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó vi khuẩn này còn bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa malat dehydrogenaza.

26. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó xitrat syntaza không nhạy NADH được mã hóa bởi *gltA* hoặc thể đột biến R163L của *gltA*.

27. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó một hoặc nhiều gen mã hóa các enzym được biểu hiện ngoại sinh này được liên hợp vào ổ gen *fimD* của sinh vật chủ.

28. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó sinh vật nói trên biểu hiện hệ thống hấp thu sucroza không-phosphotransferaza.

29. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó sinh vật nói trên còn bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa lactat dehydrogenaza nội sinh, trong đó lactat

dehydrogenaza này xúc tác cho phản ứng chuyển đổi qua lại của lactat và pyruvat, rượu dehydrogenaza, trong đó rượu dehydrogenaza này xúc tác cho phản ứng chuyển đổi qua của etanol và axetaldehyt hoặc axetaldehyt và axetyl-CoA, và pyruvat format lyaza.

30. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

sucxinyl-CoA syntetaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) aldehyt dehydrogenaza, aldehyt dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 4-hydroxybutyraldehyt, và rượu dehydrogenaza, rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyraldehyt thành 1,4-butandiol; hoặc

aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol.

31. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) glutamat CoA transferaza hoặc glutamyl-CoA hydrolaza hoặc glutamyl-CoA ligaza; glutamyl-CoA reductaza; và glutamat-5-semialdehyt reductaza; hoặc

glutamat CoA transferaza hoặc glutamyl-CoA hydrolaza hoặc glutamyl-CoA ligaza; và glutamyl-CoA reductaza tạo ra rượu; hoặc

glutamat 5-kinaza; glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza phosphoryl hóa; và glutamat-5-semialdehyt reductaza;

(b) axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza khử amin hoặc axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza; và

(c) axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza; và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza khử cacboxyl; 4-hydroxybutyrl-CoA reductaza; và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza khử cacboxyl và 4-hydroxybutyryl-CoA reducataza tạo ra rượu.

32. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

glutamat dehydrogenaza; glutamat decarboxylaza; và 4-aminobutyrat oxidoreductaza khử amin hoặc 4-aminobutyrat transaminaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza; và

(c) 4-hydroxybutyrat kinaza; phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza; và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza; 4-hydroxybutanal dehydrogenaza phosphoryl hóa; và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza; phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu; hoặc

4-hydroxybutyryl-CoA transferaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza; 4-hydroxybutyryl-CoA reducataza; và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyryl-CoA transferaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza; và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu.

33. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó alpha-ketoglutarat decarboxylaza nói trên được mã hóa bởi gen *sucA* của *Mycobacterium bovis*.

34. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó sucxinat semialdehyt dehydrogenaza, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza và 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza được mã hóa bởi các gen của *Porphyromonas gingivalis* W83.

35. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza được mã hóa bởi gen *ald* của *Clostridium beijerinckii*.

36. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA; hoặc

glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza;

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza; và

(e) 4-hydroxybutyraldehyt reductaza.

37. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó vi khuẩn này được cải biến di truyền để biểu hiện pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh.

38. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 37, trong đó một hoặc nhiều gen mã hóa tiểu đơn vị pyruvat dehydrogenaza của vi khuẩn này được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu của pyruvat format lyaza .

39. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 37, trong đó pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh nói trên không nhạy NADH.

40. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 37, trong đó pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh nói trên được mã hóa bởi gen *lpdA* của *Klebsiella pneumonia*.

41. Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo điểm 22, trong đó sucxinyl-CoA syntetaza được mã hóa bởi gen *sucCD* của *Escherichia coli*; alpha-ketoglutarat decarboxylaza được mã hóa bởi gen *sucA* của *Mycobacterium bovis*; sucxinat semialdehyt dehydrogenaza (phụ thuộc CoA), 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza và 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza được mã hóa bởi các gen của *Porphyromonas gingivalis* W83; butyrat kinaza và phosphotransbutyrylaza được mã hóa bởi gen *buk1* và *ptb* của *Clostridium acetobutilicum*; 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza được mã hóa bởi gen *ald* của *Clostridium beijerinckii*; 4-hydroxybutanal reductaza được mã hóa bởi gen *adh1* của *Geobacillus thermoglucosidasius*; pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh không nhạy NADH; pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh này được mã hóa bởi gen *lpdA* của *Klebsiella pneumonia*; hoặc phosphoenolpyruvat carboxykinaza được mã hóa bởi gen phosphoenolpyruvat carboxykinaza của *Haemophilus influenza*.

42. *Escherichia coli* không có trong tự nhiên, có quá trình sản sinh 1,4-butandiol (BDO) bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit khác loại mã hóa các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sinh tổng hợp BDO, trong đó *E. coli* này:

(A) có quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA; hoặc

glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol; và

(B) bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa protein trong hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí; hoặc biểu hiện xitrat syntaza ngoại sinh không nhạy NADH.

43. E coli không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó *E. coli* này bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa protein trong hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí.

44. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 43, trong đó gen mã hóa the protein trong hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí này là gen *arcA*.

45. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó *E. coli* này biểu hiện xitrat syntaza ngoại sinh không nhạy NADH.

46. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 45, trong đó xitrat syntaza không nhạy NADH này được mã hóa bởi gen *gltA* hoặc thể đột biến gen *gltA* mã hóa xitrat syntaza không nhạy NADH thể đột biến R163L.

47. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó *E. coli* này còn biểu hiện phosphoenolpyruvat carboxykinaza ngoại sinh.

48. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó *E. coli* này còn bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa malat dehydrogenaza.

49. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó một hoặc nhiều trong số một hoặc nhiều nucleotit khác loại nói trên mã hóa enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được liên hợp vào ổ gen *fimD* của *E. coli*.

50. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó *E. coli* này còn biểu hiện hệ hấp thụ sucroza không phosphotransferaza ngoại sinh.

51. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó *E. coli* này còn bao gồm đột biến phã vỡ lactat dehydrogenaza nội sinh, rượu dehydrogenaza nội sinh, và pyruvat format lyaza nội sinh.

52. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó *E. coli* này còn biểu hiện pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh.

53. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 52, trong đó một hoặc nhiều gen mã hóa tiểu đơn vị pyruvat dehydrogenaza được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu của pyruvat format lyaza .

54. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 52, trong đó pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh nói trên không nhạy NADH.

55. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 52, trong đó pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh nói trên được mã hóa bởi gen *lpdA* của *Klebsiella pneumonia*.

56. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó sucxinat semialdehyt dehydrogenaza, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza và 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza nói trên được mã hóa bởi các gen của *Porphyromonas gingivalis* W83.

57. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza nói trên được mã hóa bởi gen *ald* của *Clostridium beijerinckii*.

58. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó *E. coli* này còn biểu hiện sucxinyl-CoA syntetaza ngoại sinh.

59. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 58, trong đó sucxinyl-CoA syntetaza nói trên được mã hóa bởi gen *sucCD* của *Escherichia coli*.

60. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó alpha-ketoglutarat decarboxylaza nói trên được mã hóa bởi gen *sucA* của *Mycobacterium bovis*.

61. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó 4-hydroxybutyrat kinaza nói trên và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza nói trên được mã hóa bởi các gen *buk1* và *ptb* của *Clostridium acetobutylicum*.

62. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza nói trên được mã hóa bởi gen *ald* của *Clostridium beijerinckii*.

63. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 42, trong đó 4-hydroxybutyraldehyt reductaza nói trên được mã hóa bởi gen *adh1* của *Geobacillus thermoglucosidasius*.

64. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 47, trong đó phosphoenolpyruvat carboxykinaza nói trên được mã hóa bởi gen phosphoenolpyruvat carboxykinaza của *Haemophilus influenza*.

65. *Escherichia coli* không có trong tự nhiên, có quá trình sản sinh 1,4-butandiol (BDO) gồm một hoặc nhiều polynucleotit khác loại mã hóa các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO được biểu hiện với mức độ đủ để sinh tổng hợp BDO, trong đó *E. coli* này:

(A) có quá trình sản sinh BDO được chọn từ nhóm gồm có:

(i) quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA; hoặc

glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol;

(ii) quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

sucxinyl-CoA syntetaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) aldehyt dehydrogenaza, aldehyt dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 4-hydroxybutyraldehyt; và rượu dehydrogenaza, rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyraldehyt thành 1,4-butandiol; hoặc

aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol;

(iii) quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

glutamat dehydrogenaza, glutamat decarboxylaza, và 4-aminobutyrat oxidoreductaza khử amin hoặc 4-aminobutyrat transaminaza; hoặc

alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza; và

(c) 4-hydroxybutyrat kinaza, phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza, 4-hydroxybutanal dehydrogenaza phosphoryl hóa, và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza, phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza, và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu; hoặc

4-hydroxybutyryl-CoA transferaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyryl-CoA transferaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza, và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu; và

(iv) quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) glutamat CoA transferaza hoặc glutamyl-CoA hydrolaza hoặc glutamyl-CoA ligaza; glutamyl-CoA reductaza, và glutamat-5-semialdehyt reductaza; hoặc

glutamat CoA transferaza hoặc glutamyl-CoA hydrolaza hoặc glutamyl-CoA ligaza, và glutamyl-CoA reductaza tạo ra rượu; hoặc

glutamat 5-kinaza, glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza phosphoryl hóa, và glutamat-5-semialdehyt reductaza;

(b) axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza khử amin hoặc axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza; và

(c) axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza, và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza khử cacboxyl, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza khử cacboxyl và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu; và

(B) bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa protein trong hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí; hoặc biểu hiện xitrat syntaza ngoại sinh không nhạy NADH.

66. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza.

67. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza;

68. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza.

69. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza;

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza.

70. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza.

71. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza.

72. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; và

(d) aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol.

73. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; và

(d) aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol;

74. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; và

(d) aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol.

75. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol.

76. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol.

77. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) glutamat:sucxinat semialdehyt transaminaza và glutamat decarboxylaza;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol.

78. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

sucxinyl-CoA syntetaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza;

(c) 4-hydroxybutyryl-CoA transferaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza; và

(d) aldehyt dehydrogenaza, aldehyt dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 4-hydroxybutyraldehyt; và rượu dehydrogenaza, rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyraldehyt thành 1,4-butandiol; hoặc

aldehyt/rượu dehydrogenaza, aldehyt/rượu dehydrogenaza này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,4-butandiol.

79. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) alpha-ketoglutarat decarboxylaza; hoặc

glutamat dehydrogenaza, glutamat decarboxylaza, và 4-aminobutyrat oxidoreductaza khử amin hoặc 4-aminobutyrat transaminaza; hoặc

alpha-ketoglutarat dehydrogenaza và sucxinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc CoA;

(b) 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza; và

(c) 4-hydroxybutyrat kinaza, phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza, 4-hydroxybutanal dehydrogenaza phosphoryl hóa, và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyrat kinaza, phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza, và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu; hoặc

4-hydroxybutyryl-CoA transferaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

4-hydroxybutyryl-CoA transferaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA hydrolaza hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA ligaza, và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu.

80. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 65, trong đó quá trình sản sinh BDO gồm có:

(a) glutamat CoA transferaza hoặc glutamyl-CoA hydrolaza hoặc glutamyl-CoA ligaza, glutamyl-CoA reductaza, và glutamat-5-semialdehyt reductaza; hoặc

glutamat CoA transferaza hoặc glutamyl-CoA hydrolaza hoặc glutamyl-CoA ligaza, và glutamyl-CoA reductaza tạo ra rượu; hoặc

glutamat 5-kinaza, glutamat-5-semialdehyt dehydrogenaza phosphoryl hóa, và glutamat-5-semialdehyt reductaza;

(b) axit 2-amino-5-hydroxypentanoic oxidoreductaza khử amin hoặc axit 2-amino-5-hydroxypentanoic transaminaza; và

(c) axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic decarboxylaza, và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza khử cacboxyl, 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza, và 4-hydroxybutyraldehyt reductaza; hoặc

axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic dehydrogenaza khử cacboxyl và 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo ra rượu.

81. *E coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó *E. coli* này bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa protein trong hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí.

82. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 81, trong đó gen mã hóa protein trong hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí nói trên là gen *arcA*.

83. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó *E. coli* này biểu hiện xitrat syntaza ngoại sinh không nhạy NADH.

84. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 83, trong đó xitrat syntaza không nhạy NADH nói trên được mã hóa bởi gen *gltA* hoặc thể đột biến gen *gltA* mã hóa xitrat syntaza thể đột biến R163L không nhạy NADH.

85. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 84, trong đó xitrat syntaza không nhạy NADH nói trên được mã hóa bởi gen *gltA*.

86. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 84, trong đó xitrat syntaza không nhạy NADH nói trên được mã hóa bởi thể đột biến gen *gltA* mã hóa xitrat syntaza thể đột biến R163L không nhạy NADH.

87. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó *E. coli* này bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa protein trong hệ thống điều hòa kiểm soát hô hấp hiếu khí và biểu hiện xitrat syntaza ngoại sinh không nhạy NADH.

88. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó *E. coli* này còn biểu hiện phosphoenolpyruvat carboxykinaza ngoại sinh

89. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, còn bao gồm đột biến phá vỡ gen mã hóa malat dehydrogenaza.

90. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó một hoặc nhiều trong số một hoặc nhiều polynucleotit khác loại mã hóa các enzym tham gia vào quá trình sản sinh BDO nói trên được hợp nhất vào ổ gen *fimD* của *E. coli*.

91. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó *E. coli* này còn biểu hiện hệ hấp thu sucroza không phosphotransferaza ngoại sinh.

92. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó *E. coli* này còn bao gồm đột biến phá vỡ lactat dehydrogenaza nội sinh, rượu dehydrogenaza nội sinh, và pyruvat format lyaza nội sinh.

93. E. coli không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó *E. coli* này còn biểu hiện pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh.

94. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 93, trong đó một hoặc nhiều gen mã hóa tiểu đơn vị pyruvat dehydrogenaza được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu của pyruvat format lyaza .

95. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 93, trong đó pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh nói trên không nhạy NADH.

96. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 93, trong đó pyruvat dehydrogenaza ngoại sinh nói trên được mã hóa bởi gen *lpdA* của *Klebsiella pneumonia*.

97. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó sucxinat semialdehyt dehydrogenaza, 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza và 4-hydroxybutyryl-CoA/axetyl-CoA transferaza nói trên được mã hóa bởi các gen của *Porphyromonas gingivalis* W83.

98. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó *E. coli* này còn biểu hiện sucxinyl-CoA syntetaza ngoại sinh.

99. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm 98, trong đó sucxinyl-CoA syntetaza nói trên được mã hóa bởi gen *sucCD* của *Escherichia coli*.

100. *E. coli* không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 80, trong đó 4-hydroxybutyryl-CoA reductaza nói trên được mã hóa bởi gen *ald* của *Clostridium beijerinckii*; alpha-ketoglutarat decarboxylaza nói trên được mã hóa bởi gen *sucA* của *Mycobacterium bovis*; 4-hydroxybutyrat kinaza nói trên và phosphotrans-4-hydroxybutyrylaza nói trên được mã hóa bởi các gen *buk1* và *ptb* của *Clostridium acetobutylicum*; 4-hydroxybutyraldehyt reductaza nói trên được mã hóa bởi gen *adh1* của *Geobacillus thermoglucosidasius*; hoặc phosphoenolpyruvat carboxykinaza nói trên được mã hóa bởi gen phosphoenolpyruvat carboxykinaza của *Haemophilus influenza*.

101. Phương pháp sản xuất 1,4-butandiol (BDO), trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65 đến 100 trong các điều kiện và trong khoảng thời gian đủ để tạo ra BDO.

102. Phương pháp theo điểm 101, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tách BDO.

103. Phương pháp theo điểm 102, trong đó BDO được tách bằng cách chưng cất.

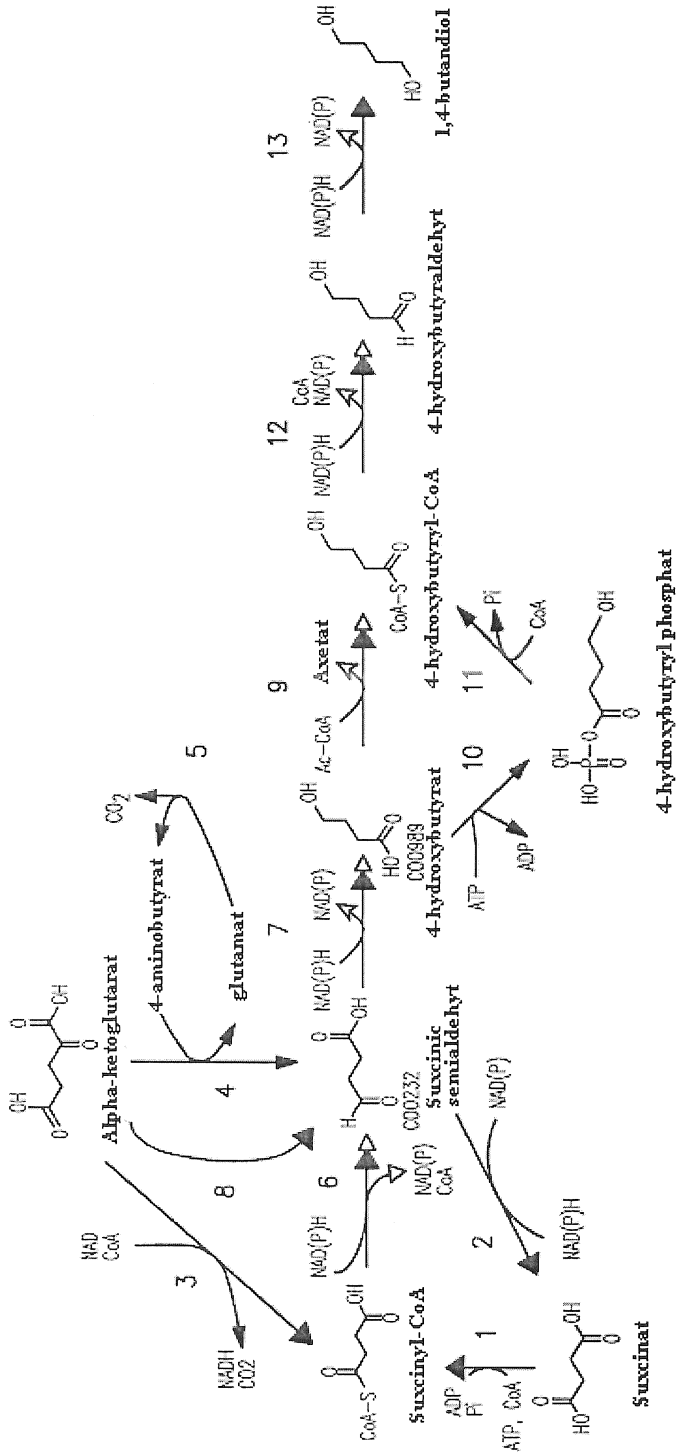

Alpha-ketoglutarat
4-aminobutyrat
glutamat
Suxcinyl-CoA
Suxcinic semialdehyt
4-hydroxybutyrat
4-hydroxybutyryl-CoA
4-hydroxybutyraldehyt
1,4-butandiol
Axetat
Suxcinat
4-hydroxybutyryl phosphat
NAD
CoA
NADH
CO2
NAD(P)H
NAD(P)
ADP
Pi
ATP
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

Fig.1

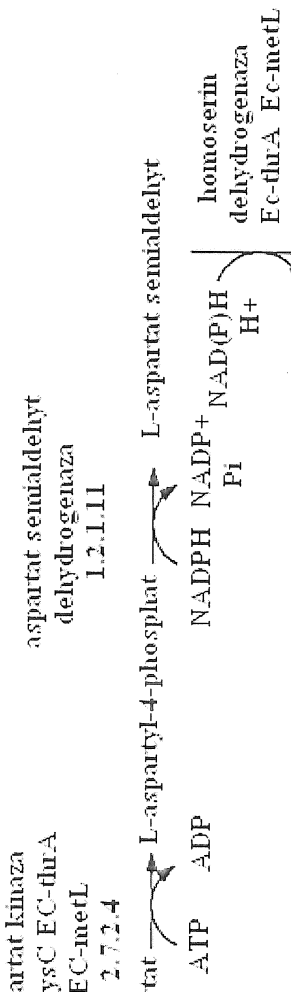

Quá trình sinh
tổng hợp Aspartat
L-aspartat
aspartat kinaza
Ec-lysC EC-thrA
EC-metL
2.7.2.4
ATP
ADP
L-aspartyl-4-phosphat
aspartat semialdehyt
dehydrogenaza
1.2.1.11
NADPH
NADP+
Pi
L-aspartat semialdehyt
NAD(P)H
H+
NAD(P)
homoserin
homoserin
dehydrogenaza
Ec-thrA Ec-metL
1.1.1.3
Quá trình sinh tổng hợp Threonin từ homoserin
Quá trình sinh tổng hợp Methionin I, II, III

Fig.2

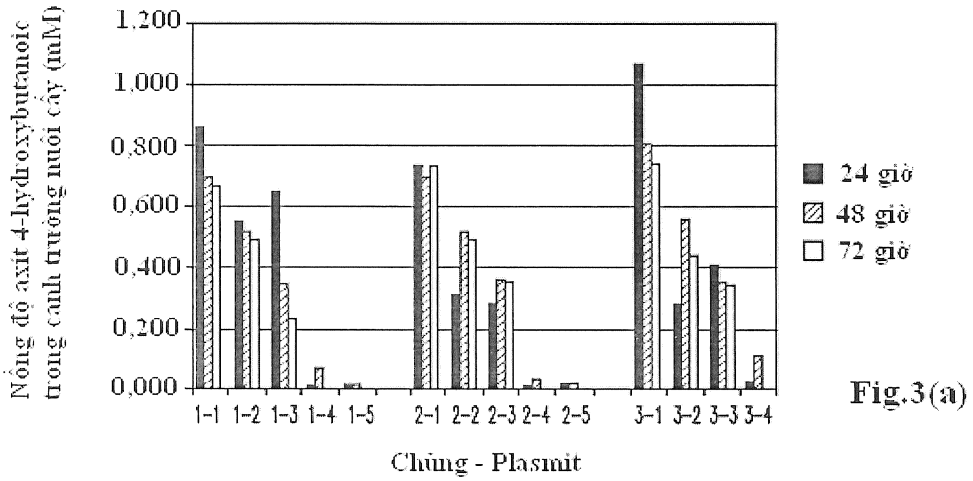


Fig.3(a)

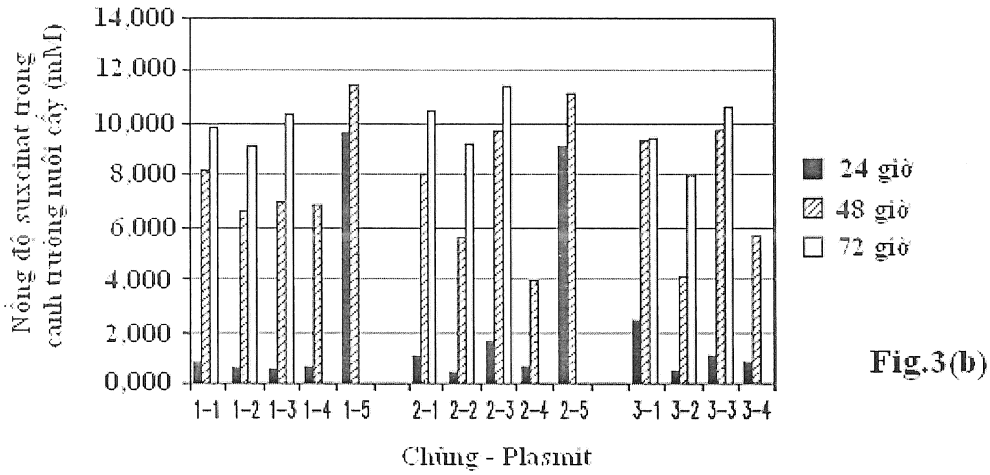


Fig.3(b)

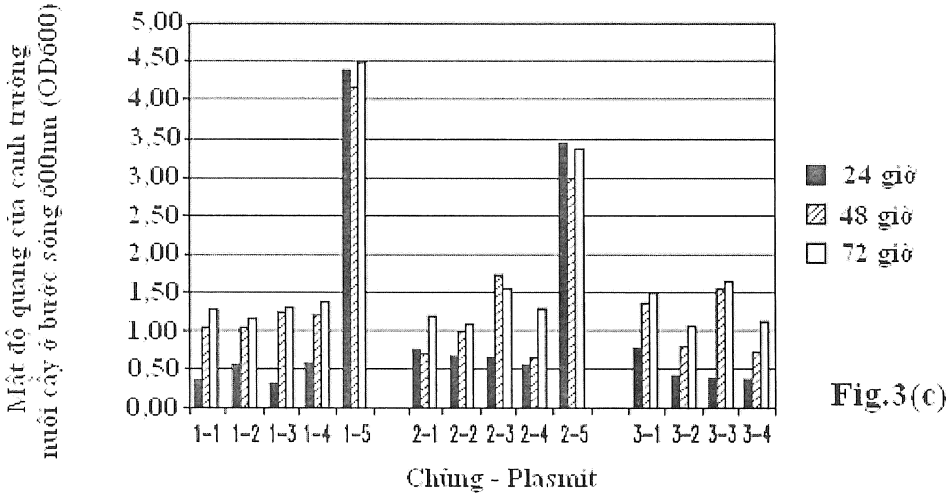


Fig.3(c)

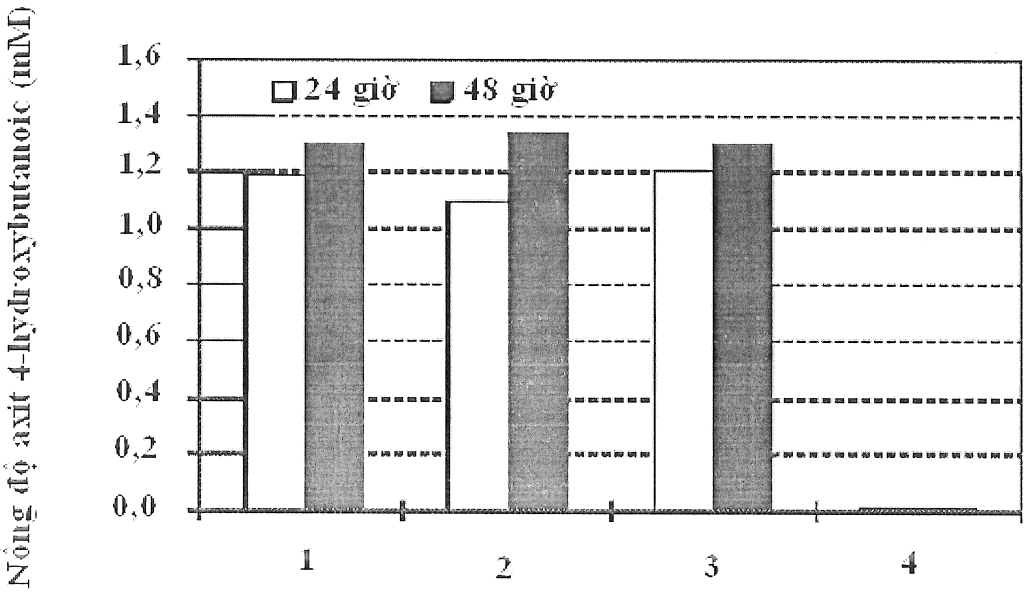

Nồng độ axit 4-hydroxybutanoic (mM)
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
24 giờ
48 giờ
1
2
3
4

Fig.4

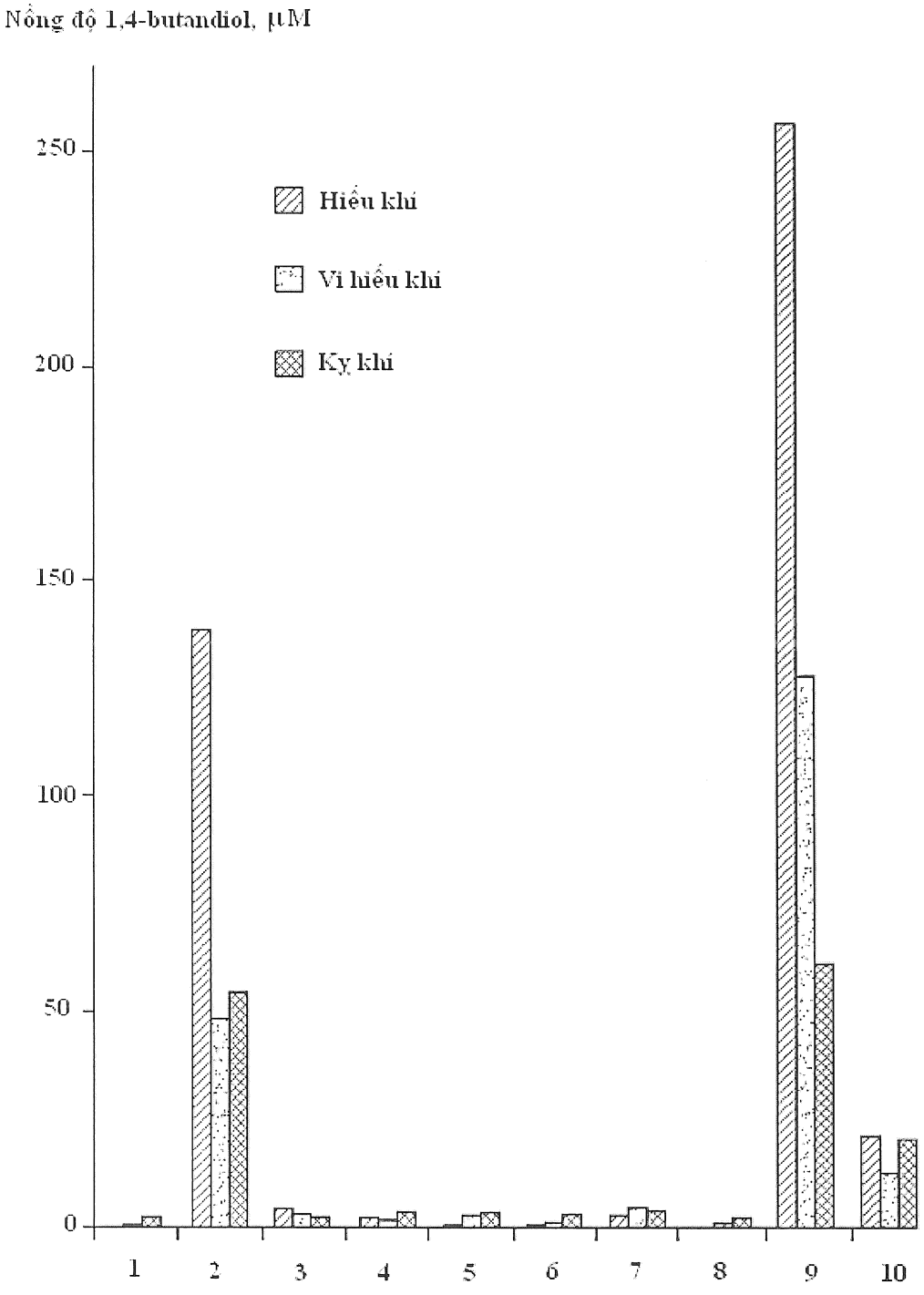

Nồng độ 1,4-butandiol, µM
250
200
150
100
50
0
Hiếu khí
Vi hiếu khí
Kỵ khí
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Fig.5

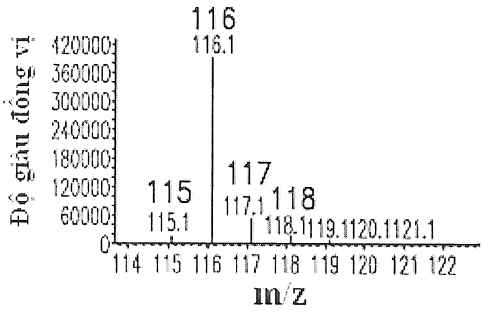


Fig.6(a)

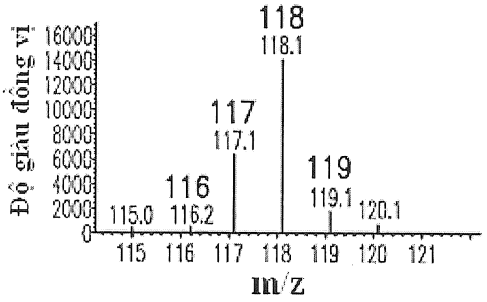


Fig.6(b)

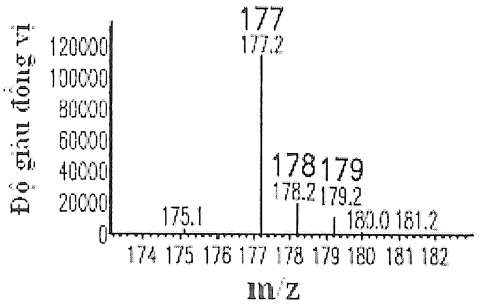


Fig.6(c)

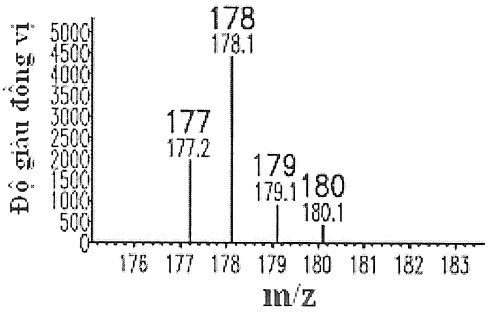


Fig.6(d)

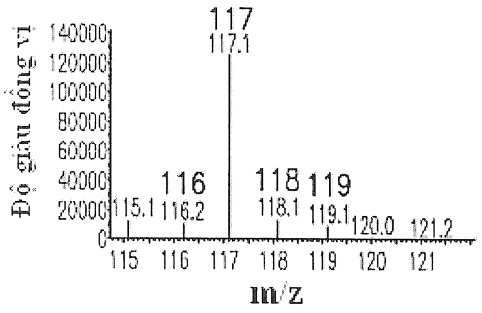


Fig.6(e)

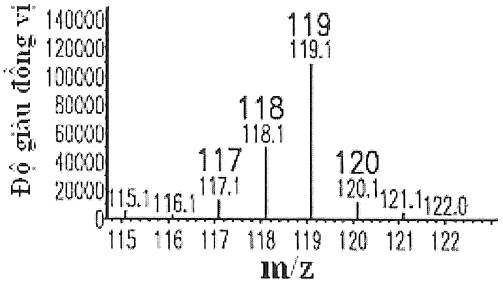


Fig.6(f)

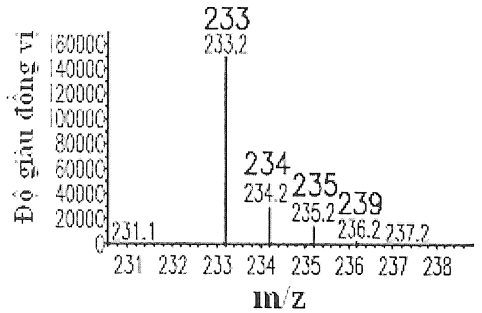


Fig.6(g)

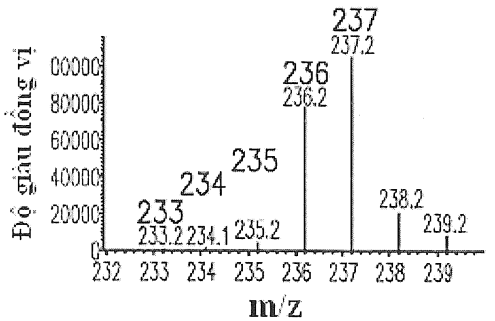
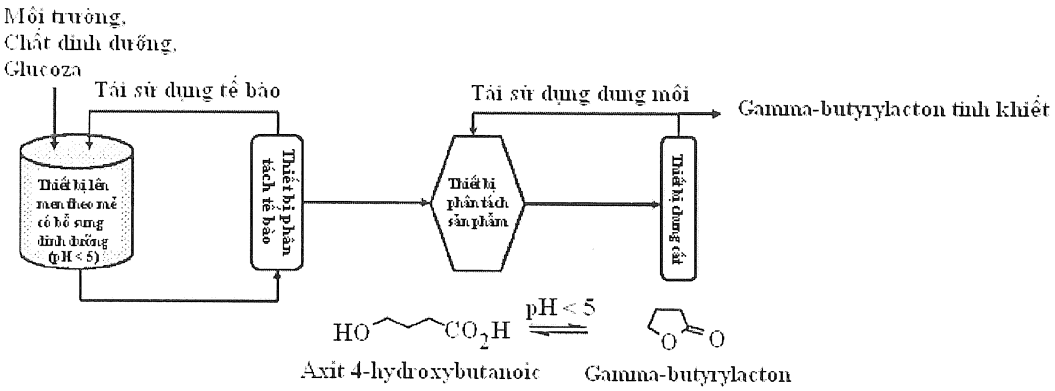


Fig.6(h)


Môi trường,
Chất dinh dưỡng,
Glucoza
Tái sử dụng tế bào
Tái sử dụng dung môi
Gamma-butyrylacton tinh khiết
Thiết bị lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng (pH < 5)
Thiết bị phân tách tế bào
Thiết bị phân tách sản phẩm
Thiết bị chưng cất
pH < 5
HO
CO2H
O
O
Axit 4-hydroxybutanoic
Gamma-butyrylacton

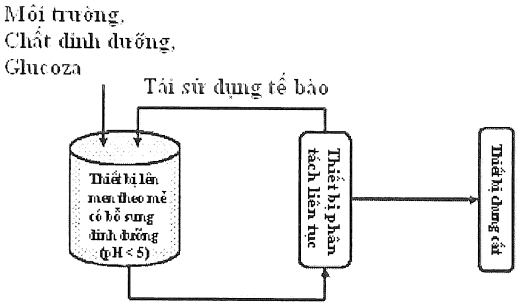

Môi trường,
Chất dinh dưỡng,
Glucoza
Tái sử dụng tế bào
Thiết bị lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng (pH < 5)
Thiết bị phân tách liên tục
Thiết bị chưng cất

Fig.7

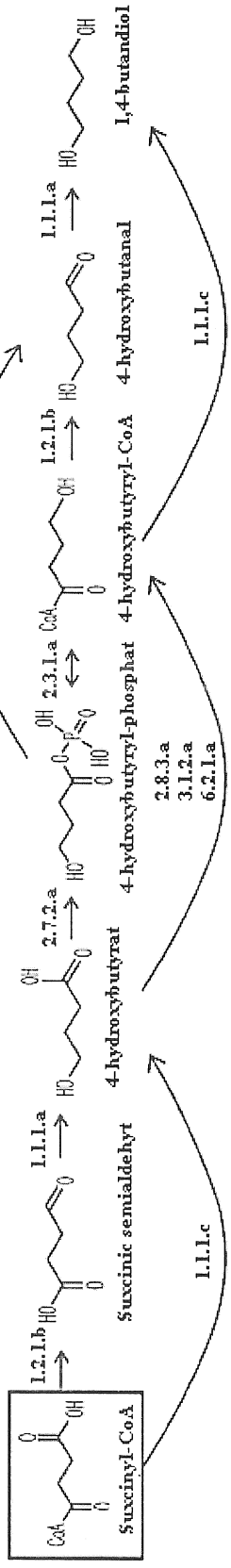

Succinyl-CoA
1.2.1.b
Succinic semialdehyt
1.1.1.a
4-hydroxybutyrat
2.7.2.a
4-hydroxybutyryl-phosphat
2.3.1.a
4-hydroxybutyryl-CoA
1.2.1.b
4-hydroxybutanal
1.1.1.a
1,4-butandiol
1.1.1.c
1.2.1.d
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a

Fig.8A

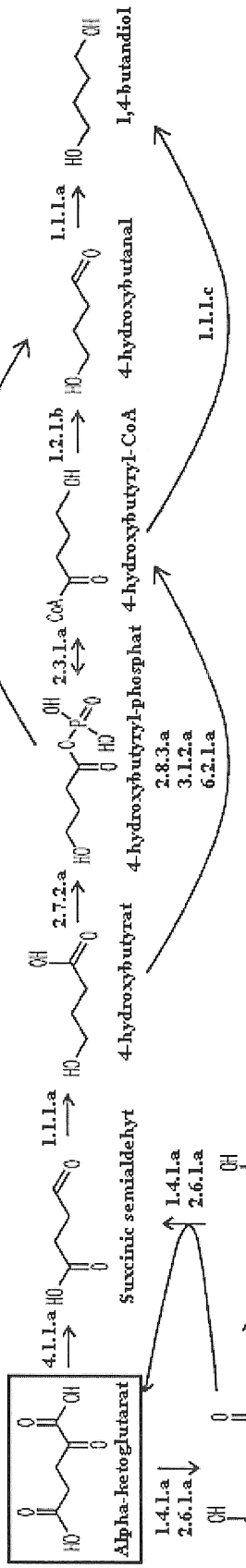

Alpha-ketoglutarat
4.1.1.a
Succinic semialdehyt
1.1.1.a
4-hydroxybutyrat
2.7.2.a
4-hydroxybutyryl-phosphat
2.3.1.a
4-hydroxybutyryl-CoA
1.2.1.b
4-hydroxybutanal
1.1.1.a
1,4-butandiol
1.1.1.c
1.2.1.d
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
1.4.1.a
2.6.1.a
Glutamat
4.1.1.a
4-aminobutyrat

Fig.8B

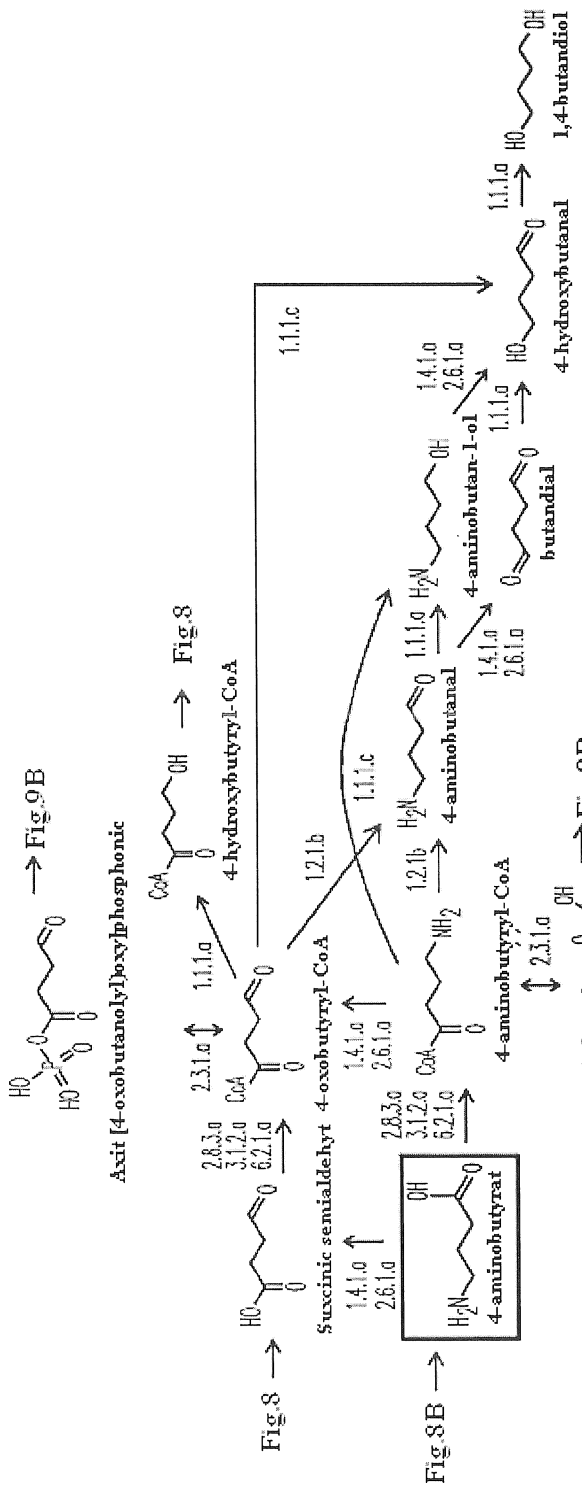

Fig.9B
Axit [4-oxobutanolylboxylphosphonic
Fig.8
Succinic semialdehyt
4-oxobutyryl-CoA
4-hydroxybutyryl-CoA
Fig.8
4-aminobutyrat
Fig.8B
4-aminobutyryl-CoA
4-aminobutanal
4-aminobutan-1-ol
butandial
4-hydroxybutanal
1,4-butandiol
Fig.9B
Axit [4-aminobutanolylboxylphosphonic

Fig.9A

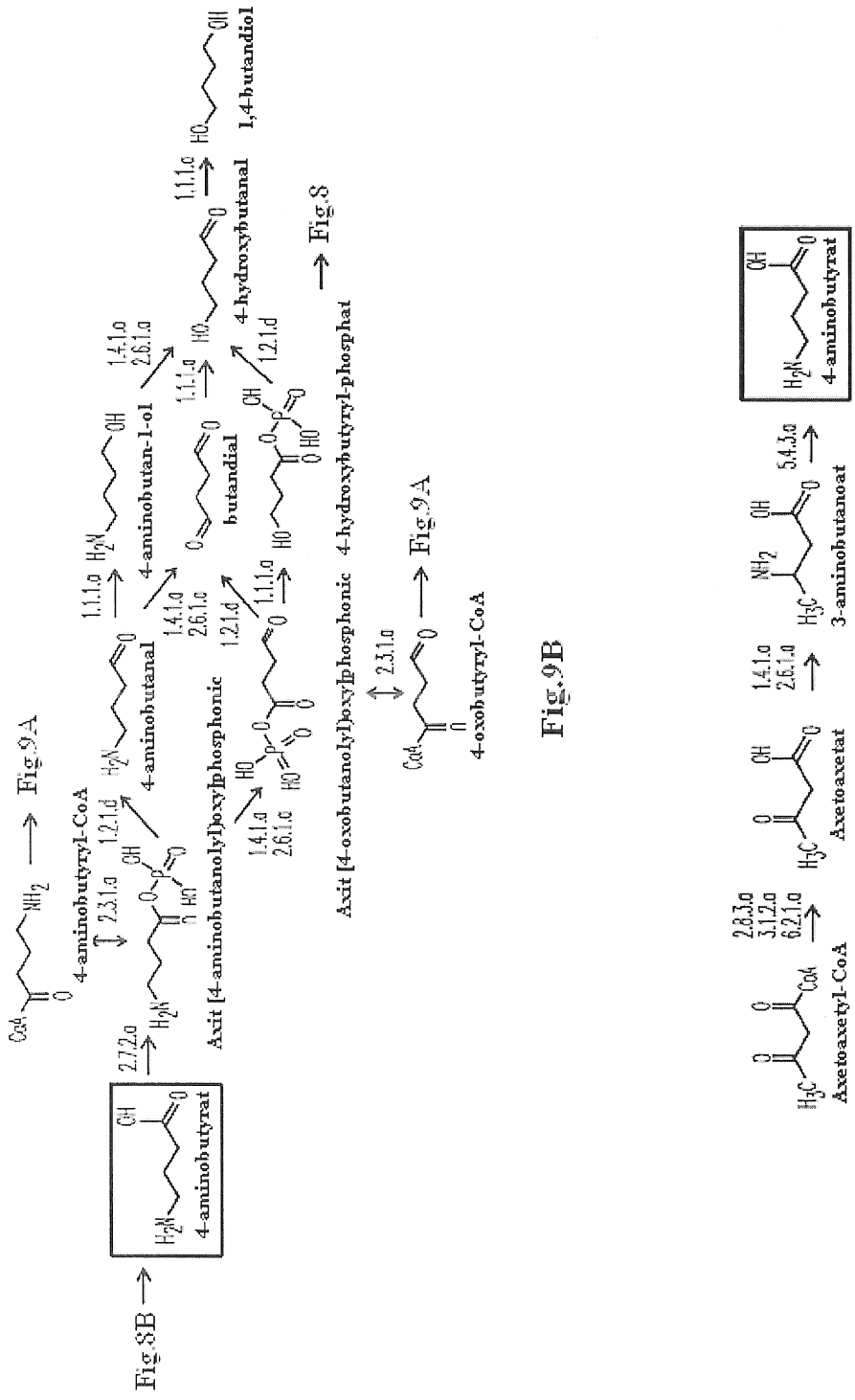

Fig.8B
2.7.2.a
4-aminobutyrat
Axit [4-aminobutanolyl]oxylphosphonic
1.4.1.a
2.6.1.a
Axit [4-oxobutanolyl]oxylphosphonic
1.2.1.d
1.1.1.a
4-hydroxybutyryl-phosphat
Fig.8
2.3.1.a
4-oxobutyryl-CoA
Fig.9A
4-aminobutyryl-CoA
2.3.1.a
1.2.1.d
4-aminobutanal
1.1.1.a
4-aminobutan-1-ol
1.4.1.a
2.6.1.a
butandial
1.1.1.a
4-hydroxybutanal
1.1.1.a
1,4-butandiol

Fig.9B

4-aminobutyrat

3-aminobutanoat
5.4.3.a

Axetoaxetat
1.4.1.a
2.6.1.a

Axetoaxetyl-CoA
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a

Fig.9C

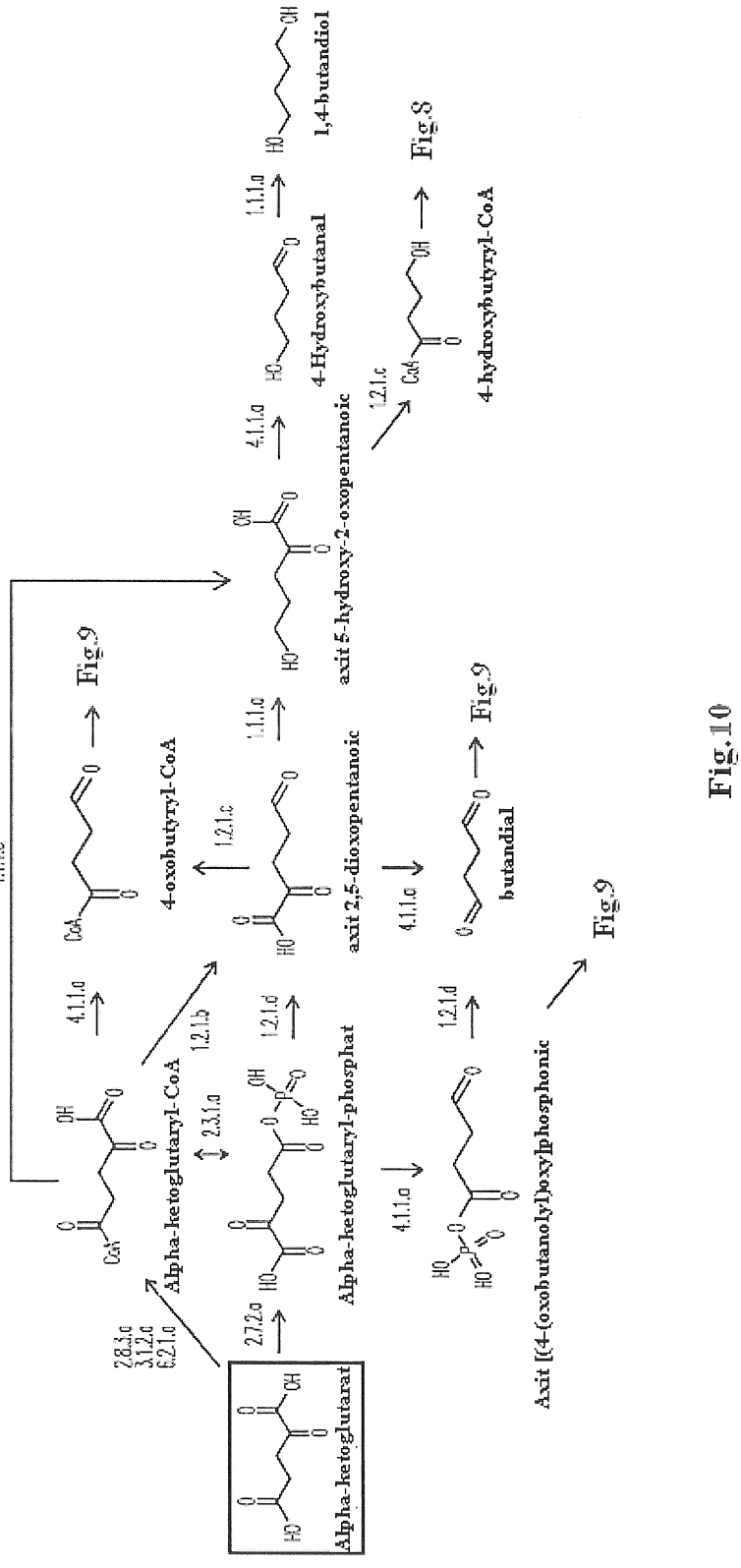

2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
Alpha-ketoglutarat
2.7.2.a
Alpha-ketoglutaryl-phosphat
2.3.1.a
Alpha-ketoglutaryl-CoA
1.2.1.b
4.1.1.a
4-oxobutyryl-CoA
Fig.9
1.1.1.c
1.2.1.d
4.1.1.a
Axit [(4-(oxobutanolyl)oxy]phosphonic
Fig.9
1.2.1.c
axit 2,5-dioxopentanoic
1.1.1.a
axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic
4.1.1.a
butandial
Fig.9
1.2.1.c
4-Hydroxybutanal
1.1.1.a
1,4-butandiol
4-hydroxybutyryl-CoA
Fig.8

Fig.10

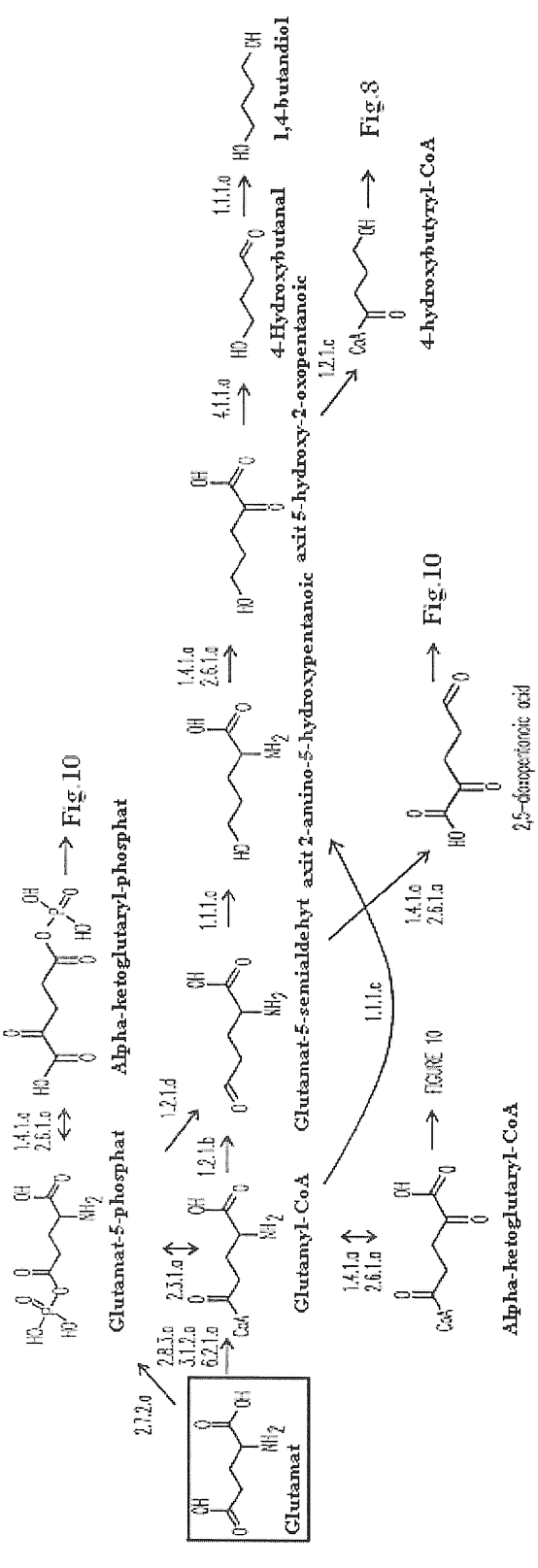

Glutamat-5-phosphat
Alpha-ketoglutaryl-phosphat
Fig.10
Glutamat
Glutamyl-CoA
Glutamat-5-semialdehyt
axit 2-amino-5-hydroxypentanoic
Alpha-ketoglutaryl-CoA
2,5-dioxopentanoic acid
Fig.10
axit 5-hydroxy-2-oxopentanoic
4-Hydroxybutanal
1,4-butandiol
4-hydroxybutyryl-CoA
Fig.8

Fig.11

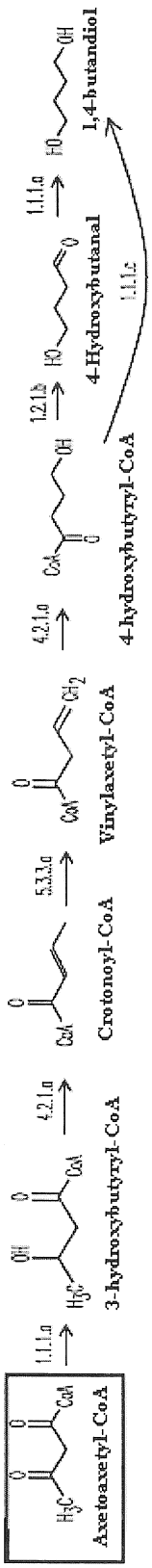

Acetoacetyl-CoA
3-hydroxybutyryl-CoA
Crotonoyl-CoA
Vinylacetyl-CoA
4-hydroxybutyryl-CoA
4-Hydroxybutanal
1,4-butandiol

Fig.12

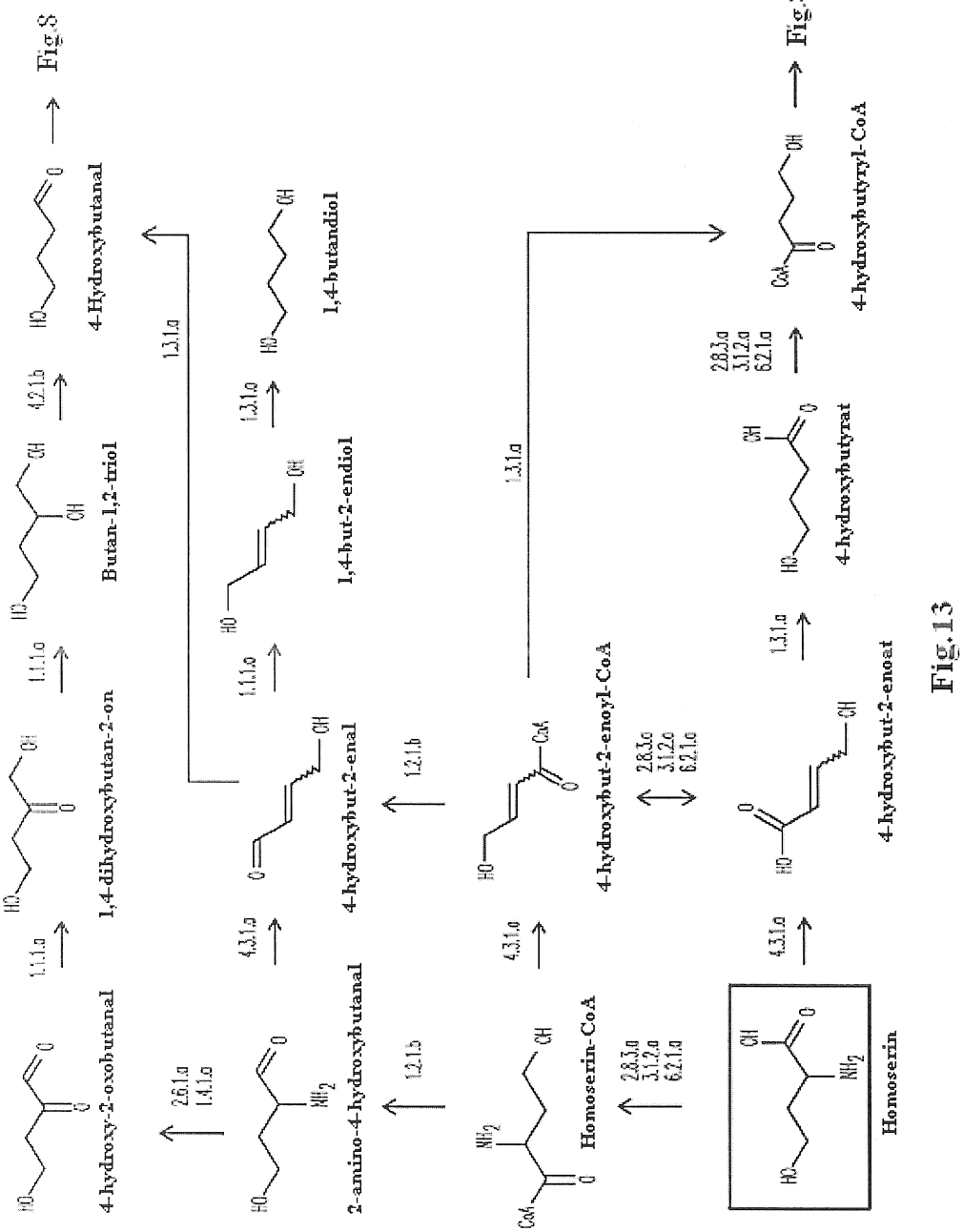

4-hydroxy-2-oxobutanal
1,4-dihydroxybutan-2-on
Butan-1,2-triol
4-Hydroxybutanal
Fig.S
2-amino-4-hydroxybutanal
4-hydroxybut-2-enal
1,4-but-2-endiol
1,4-butandiol
Homoserin-CoA
4-hydroxybut-2-enoyl-CoA
4-hydroxybutyrat
4-hydroxybutyryl-CoA
Homoserin
4-hydroxybut-2-enoat
1.1.1.a
4.2.1.b
2.6.1.a
1.4.1.a
4.3.1.a
1.1.1.b
1.3.1.a
1.2.1.b
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a

Fig.13

A.

ATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAACAACTTTTTGCCCGCTATGGCTTACCAGCACCGGTGGGTT
ATGCCTGTACTACTCCGCGCGAAGCAGAAGAAGCCGCTTCAAAAATCGGTGCCGGTCCGTGGGTAG
TGAAATGTCAGGTTCACGCTGGTGGCCGCGGTAAAGCGGGCGGTGTGAAAGTTGTAAACAGCAAA
GAAGACATCCGTGCTTTTGCAGAAAACTGGCTGGGCAAGCGTCTGGTAACGTATCAAACAGATGCC
AATGGCCAACCGGTTAACCAGATTCTGGTTGAAGCAGCGACCGATATCGCTAAAGAGCTGTATCTCG
GTGCCGTTGTTGACCGTAGTTCCCGTCGTGTGGTCTTTATGGCCTCCACCGAAGGCGGCGTGGAAAT
CGAAAAAGTGGCGGAAGAAACTCCGCACCTGATCCATAAAGTTGCGCTTGATCCGCTGACTGGCCC
GATGCCGTATCAGGGACGCGAGCTGGCGTTCAAACTGGGTCTGGAAGGTAAACTGGTTCAGCAGTT
CACCAAAATCTTCATGGGCCTGGCGACCATTTTCCTGGAGCGCGACCTGGCGTTGATCGAAATCAAC
CCGCTGGTCATCACCAAACAGGGCGATCTGATTTGCCTCGACGGCAAACTGGGCGCTGACGGCAAC
GCACTGTTCCGCCAGCCTGATCTGCGCGAAATGCGTGACCAGTCGCAGGAAGATCCGCGTGAAGCA
CAGGCTGCACAGTGGGAACTGAACTACGTTGCGCTGGACGGTAACATCGGTTGTATGGTTAACGGC
GCAGGTCTGGCGATGGGTACGATGGACATCGTTAAACTGCACGGCGGCGAACCGGCTAACTTCCTT
GACGTTGGCGGCGGCGCAACCAAAGAACGTGTAACCGAAGCGTTCAAAATCATCCTCTCTGACGAC
AAAGTGAAAGCCGTTCTGGTTAACATCTTCGGCGGTATCGTTCGTTGCGACCTGATCGCTGACGGTA
TCATCGGCGCGGTAGCAGAAGTGGGTGTTAACGTACCGGTCGTGGTACGTCTGGAAGGTAACAACG
CCGAACTCGGCGCGAAGAAACTGGCTGACAGCGGCCTGAATATTATTGCAGCAAAAGGTCTGACGG
ATGCAGCTCAGCAGGTTGTTGCCGCAGTGGAGGGGAAATAATGTCCATTTTAATCGATAAAAACACC
AAGGTTATCTGCCAGGGCTTTACCGGTAGCCAGGGGACTTTCCACTCAGAACAGGCCATTGCATACG
GCACTAAAATGGTTGGCGGCGTAACCCCAGGTAAAGGCGGCACCACCCACCTCGGCCTGCCGGTGT
TCAACACCGTGCGTGAAGCCGTTGCTGCCACTGGCGCTACCGCTTCTGTTATCTACGTACCAGCACC
GTTCTGCAAAGACTCCATTCTGGAAGCCATCGACGCAGGCATCAAACTGATTATCACCATCACTGAA
GGCATCCCGACGCTGGATATGCTGACCGTGAAAGTGAAGCTGGATGAAGCAGGCGTTCGTATGATC
GGCCCGAACTGCCCAGGCGTTATCACTCCGGGTGAATGCAAAATCGGTATCCAGCCTGGTCACATTC
ACAAACCGGGTAAAGTGGGTATCGTTTCCCGTTCCGGTACACTGACCTATGAAGCGGTTAAACAGAC
CACGGATTACGGTTTCGGTCAGTCGACCTGTGTCGGTATCGGCGGTGACCCGATCCCGGGCTCTAAC
TTTATCGACATTCTCGAAATGTTCGAAAAAGATCCGCAGACCGAAGCGATCGTGATGATCGGTGAGA
TCGGCGGTAGCGCTGAAGAAGAAGCAGCTGCGTACATCAAAGAGCACGTTACCAAGCCAGTTGTGG
GTTACATCGCTGGTGTGACTGCGCCGAAAGGCAAACGTATGGGCCACGCGGGTGCCATCATTGCCG
GTGGGAAAGGGACTGCGGATGAGAAATTCGCTGCTCTGGAAGCCGCAGGCGTGAAAACCGTTCGC
AGCCTGGCGGATATCGGTGAAGCACTGAAAACTGTTCTGAAATAA

B.

MNLHEYQAKQLFARYGLPAPVGYACTTPREAEEAASKIGAGPWVVKCQVHAGGRGKAGGVKVVNSKE
DIRAFAENWLGKRLVTYQTDANGQPVNQILVEAATDIAKELYLGAVVDRSSRRVVFMASTEGGVEIEKV
AEETPHLIHKVALDPLTGPMPYQGRELAFKLGLEGKLVQQFTKIFMGLATIFLERDLALIEINPLVITKQGDL
ICLDGKLGADGNALFRQPDLREMRDQSQEDPREAQAAQWELNYVALDGNIGCMVNGAGLAMGTMD
IVKLHGGEPANFLDVGGGATKERVTEAFKIILSDDKVKAVLVNIFGGIVRCDLIADGIIGAVAEVGVNVPVV
VRLEGNNAELGAKKLADSGLNIIAAKGLTDAAQQVVAAVEGK

C.

MSILIDKNTKVICQGFTGSQGTFHSEQAIAYGTKMVGGVTPGKGGTTHLGLPVFNTVREAVAATGATAS
VIYVPAPFCKDSILEAIDAGIKLIITITEGIPTLDMLTVKVKLDEAGVRMIGPNCPGVITPGECKIGIQPGHIHK
PGKVGIVSRSGTLTYEAVKQTTDYGFGQSTCVGIGGDPIPGSNFIDILEMFEKDPQTEAIVMIGEIGGSAEE
EAAAYIKEHVTKPVVGYIAGVTAPKGKRMGHAGAIIAGGKGTADEKFAALEAAGVKTVRSLADIGEALKT
VLK

Fig. 14

A.

ATGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAACGAATGGCTGGTTGAAGAGATGTACCGCAAGTTC
CGCGACGACCCCTCCTCGGTCGATCCCAGCTGGCACGAGTTCCTGGTTGACTACAGCCCCGAACCCA
CCTCCCAACCAGCTGCCGAACCAACCCGGGTTACCTCGCCACTCGTTGCCGAGCGGGCCGCTGCGGC
CGCCCCGCAGGCACCCCCCAAGCCGGCCGACACCGCGGCCGCGGGCAACGGCGTGGTCGCCGCACT
GGCCGCCAAAACTGCCGTTCCCCCGCCAGCCGAAGGTGACGAGGTAGCGGTGCTGCGCGGCGCCG
CCGCGGCCGTCGTCAAGAACATGTCCGCGTCGTTGGAGGTGCCGACGGCGACCAGCGTCCGGGCG
GTCCCGGCCAAGCTACTGATCGACAACCGGATCGTCATCAACAACCAGTTGAAGCGGACCCGCGGC
GGCAAGATCTCGTTCACGCATTTGCTGGGCTACGCCCTGGTGCAGGCGGTGAAGAAATTCCCGAAC
ATGAACCGGCACTACACCGAAGTCGACGGCAAGCCCACCGCGGTCACGCCGGCGCACACCAATCTC
GGCCTGGCGATCGACCTGCAAGGCAAGGACGGGAAGCGTTCCCTGGTGGTGGCCGGCATCAAGCG
GTGCGAGACCATGCGATTCGCGCAGTTCGTCACGGCCTACGAAGACATCGTACGCCGGGCCCGCGA
CGGCAAGCTGACCACTGAAGACTTTGCCGGCGTGACGATTTCGCTGACCAATCCCGGAACCATCGGC
ACCGTGCATTCGGTGCCGCGGCTGATGCCCGGCCAGGGCGCCATCATCGGCGTGGGCGCCATGGAA
TACCCCGCCGAGTTTCAAGGCGCCAGCGAGGAACGCATCGCCGAGCTGGGCATCGGCAAATTGATC
ACTTTGACCTCCACCTACGACCACCGCATCATCCAGGGCGCGGAATCGGGCGACTTCCTGCGCACCA
TCCACGAGTTGCTGCTCTCGGATGGCTTCTGGGACGAGGTCTTCCGCGAACTGAGCATCCCATATCT
GCCGGTGCGCTGGAGCACCGACAACCCCGACTCGATCGTCGACAAGAACGCTCGCGTCATGAACTT
GATCGCGGCCTACCGCAACCGCGGCCATCTGATGGCCGATACCGACCCGCTGCGGTTGGACAAAGC
TCGGTTCCGCAGTCACCCCGACCTCGAAGTGCTGACCCACGGCCTGACGCTGTGGGATCTCGATCGG
GTGTTCAAGGTCGACGGCTTTGCCGGTGCGCAGTACAAGAAACTGCGCGACGTGCTGGGCTTGCTG
CGCGATGCCTACTGCCGCCACATCGGCGTGGAGTACGCCCATATCCTCGACCCCGAACAAAAGGAG
TGGCTCGAACAACGGGTCGAGACCAAGCACGTCAAACCCACTGTGGCCCAACAGAAATACATCCTC
AGCAAGCTCAACGCCGCCGAGGCCTTTGAAACGTTCCTACAGACCAAGTACGTCGGCCAGAAGCGG
TTCTCGCTGGAAGGCGCCGAAAGCGTGATCCCGATGATGGACGCGGCGATCGACCAGTGCGCTGAG
CACGGCCTCGACGAGGTGGTCATCGGGATGCCGCACCGGGGCCGGCTCAACGTGCTGGCCAACATC
GTCGGCAAGCCGTACTCGCAGATCTTCACCGAGTTCGAGGGCAACCTGAATCCGTCGCAGGCGCAC
GGCTCCGGTGACGTCAAGTACCACCTGGGCGCCACCGGGCTGTACCTGCAGATGTTCGGCGACAAC
GACATTCAGGTGTCGCTGACCGCCAACCCGTCGCATCTGGAGGCCGTCGACCCGGTGCTGGAGGGA
TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTCGACCACGGAAGCATCGACAGCGACGGCCAACGGGCGTT
CTCGGTGGTGCCGCTGATGTTGCATGGCGATGCCGCGTTCGCCGGTCAGGGTGTGGTCGCCGAGAC
GCTGAACCTGGCGAATCTGCCGGGCTACCGCGTCGGCGGCACCATCCACATCATCGTCAACAACCAG
ATCGGCTTCACCACCGCGCCCGAGTATTCCAGGTCCAGCGAGTACTGCACCGACGTCGCAAAGATGA
TCGGGGCACCGATCTTTCACGTCAACGGCGACGACCCGGAGGCGTGTGTCTGGGTGGCGCGGTTGG
CGGTGGACTTCCGACAACGGTTCAAGAAGGACGTCGTCATCGACATGCTGTGCTACCGCCGCCGCG
GGCACAACGAGGGTGACGACCCGTCGATGACCAACCCCTACATGTACGACGTCGTCGACACCAAGC
GCGGGGCCCGCAAAAGCTACACCGAAGCCCTGATCGGACGTGGCGACATCTCGATGAAGGAGGCC
GAGGACGCGCTGCGCGACTACCAGGGCCAGCTGGAACGGGTGTTCAACGAAGTGCGCGAGCTGGA
GAAGCACGGTGTGCAGCCGAGCGAGTCGGTCGAGTCCGACCAGATGATTCCCGCGGGGCTGGCCA
CTGCGGTGGACAAGTCGCTGCTGGCCCGGATCGGCGATGCGTTCCTCGCCTTGCCGAACGGCTTCAC
CGCGCACCCGCGAGTCCAACCGGTGCTGGAGAAGCGCCGGGAGATGGCCTATGAAGGCAAGATCG
ACTGGGCCTTTGGCGAGCTGCTGGCGCTGGGCTCGCTGGTGGCCGAAGGCAAGCTGGTGCGCTTGT
CGGGGCAGGACAGCCGCCGCGGCACCTTCTCCCAGCGGCATTCGGTTCTCATCGACCGCCACACTG
GCGAGGAGTTCACACCACTGCAGCTGCTGGCGACCAACTCCGACGGCAGCCCGACCGGCGGAAAGT
TCCTGGTCTACGACTCGCCACTGTCGGAGTACGCCGCCGTCGGCTTCGAGTACGGCTACACTGTGGG
CAATCCGGACGCCGTGGTGCTCTGGGAGGCGCAGTTCGGCGACTTCGTCAACGGCGCACAGTCGAT
CATCGACGAGTTCATCAGCTCCGGTGAGGCCAAGTGGGGCCAATTGTCCAACGTCGTGCTGCTGTTA

Fig.15

CCGCACGGGCACGAGGGGCAGGGACCCGACCACACTTCTGCCCGGATCGAACGCTTCTTGCAGTTG
TGGGCGGAAGGTTCGATGACCATCGCGATGCCGTCGACTCCGTCGAACTACTTCCACCTGCTACGCC
GGCATGCCCTGGACGGCATCCAACGCCCGCTGATCGTGTTCACGCCCAAGTCGATGTTGCGTCACAA
GGCCGCCGTCAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCCGCTCAGTGCTGGAGGAACCCAC
CTATGAGGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTCAGCCGGATCCTGCTGACCAGTGGCAAGCTGTA
TTACGAGCTGGCCGCCCGCAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACA
GCTCGCCCCGCTGCCCAGGCGTCGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAACGTCAAGGAGTT
CTTCTGGGTCCAAGAGGAACCGGCCAACCAGGGTGCGTGGCCGCGATTCGGGCTCGAACTACCCGA
GCTGCTGCCTGACAAGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCCGTCGTC
AGGCTCGTCGAAGGTGCACGCCGTCGAACAGCAGGAGATCCTCGACGAGGCGTTCGGCTAA

B.

MANISSPFGQNEWLVEEMYRKFRDDPSSVDPSWHEFLVDYSPEPTSQPAAEPTRVTSPLVAERAAAAA
PQAPPKPADTAAAGNGVVAALAAKTAVPPPAEGDEVAVLRGAAAAVVKNMSASLEVPTATSVRAVPA
KLLIDNRIVINNQLKRTRGGKISFTHLLGYALVQAVKKFPNMNRHYTEVDGKPTAVTPAHTNLGLAIDLQ
GKDGKRSLVVAGIKRCETMRFAQFVTAYEDIVRRARDGKLTTEDFAGVTISLTNPGTIGTVHSVPRLMPG
QGAIIGVGAMEYPAEFQGASEERIAELGIGKLITLTSTYDHRIIQGAESGDFLRTIHELLLSDGFWDEVFREL
SIPYLPVRWSTDNPDSIVDKNARVMNLIAAYRNRGHLMADTDPLRLDKARFRSHPDLEVLTHGLTLWDL
DRVFKVDGFAGAQYKKLRDVLGLLRDAYCRHIGVEYAHILDPEQKEWLEQRVETKHVKPTVAQQKYILSK
LNAAEAFETFLQTKYVGQKRFSLEGAESVIPMMDAAIDQCAEHGLDEVVIGMPHRGRLNVLANIVGKPY
SQIFTEFEGNLNPSQAHGSGDVKYHLGATGLYLQMFGDNDIQVSLTANPSHLEAVDPVLEGLVRAKQDL
LDHGSIDSDGQRAFSVVPLMLHGDAAFAGQGVVAETLNLANLPGYRVGGTIHIIVNNQIGFTTAPEYSRS
SEYCTDVAKMIGAPIFHVNGDDPEACVWVARLAVDFRQRFKKDVVIDMLCYRRRGHNEGDDPSMTNP
YMYDVVDTKRGARKSYTEALIGRGDISMKEAEDALRDYQGQLERVFNEVRELEKHGVQPSESVESDQMI
PAGLATAVDKSLLARIGDAFLALPNGFTAHPRVQPVLEKRREMAYEGKIDWAFGELLALGSLVAEGKLVR
LSGQDSRRGTFSQRHSVLIDRHTGEEFTPLQLLATNSDGSPTGGKFLVYDSPLSEYAAVGFEYGYTVGNPD
AVVLWEAQFGDFVNGAQSIIDEFISSGEAKWGQLSNVVLLLPHGHEGQGPDHTSARIERFLQLWAEGS
MTIAMPSTPSNYFHLLRRHALDGIQRPLIVFTPKSMLRHKAAVSEIKDFTEIKFRSVLEEPTYEDGIGDRNK
VSRILLTSGKLYYELAARKAKDNRNDLAIVRLEQLAPLPRRRLRETLDRYENVKEFFWVQEEPANQGAWP
RFGLELPELLPDKLAGIKRISRRAMSAPSSGSSKVHAVEQQEILDEAFG

Fig.15 (tiếp theo)

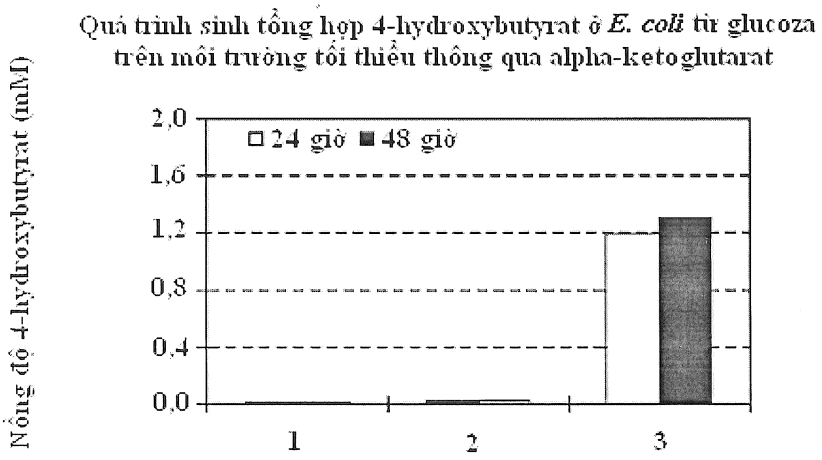

Quá trình sinh tổng hợp 4-hydroxybutyrat ở E. coli từ glucoza trên môi trường tối thiểu thông qua alpha-ketoglutarat
Nồng độ 4-hydroxybutyrat (mM)
24 giờ
48 giờ
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
1
2
3

Fig.16

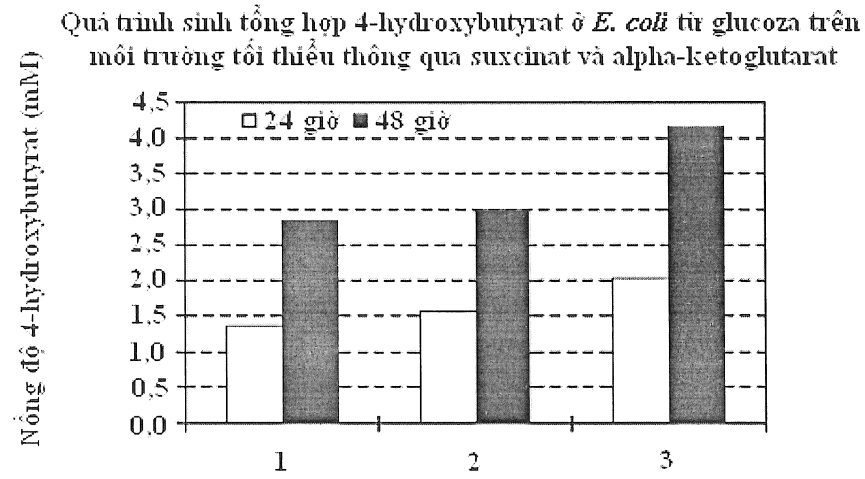

Quá trình sinh tổng hợp 4-hydroxybutyrat ở E. coli từ glucoza trên môi trường tối thiểu thông qua suxcinat và alpha-ketoglutarat
Nồng độ 4-hydroxybutyrat (mM)
24 giờ
48 giờ
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
1
2
3

Fig.17

A.

ATGGAAATCAAAGAAATGGTGAGCCTTGCACGCAAGGCTCAGAAGGAGTATCAAGCTACCCATAAC
CAAGAAGCAGTTGACAACATTTGCCGAGCTGCAGCAAAAGTTATTTATGAAAATGCAGCTATTCTGG
CTCGCGAAGCAGTAGACGAAACCGGCATGGGCGTTTACGAACACAAAGTGGCCAAGAATCAAGGC
AAATCCAAAGGTGTTTGGTACAACCTCCACAATAAAAAATCGATTGGTATCCTCAATATAGACGAGC
GTACCGGTATGATCGAGATTGCAAAGCCTATCGGAGTTGTAGGAGCCGTAACGCCGACGACCAACC
CGATCGTTACTCCGATGAGCAATATCATCTTTGCTCTTAAGACCTGCAATGCCATCATTATTGCCCCCC
ACCCCAGATCCAAAAAATGCTCTGCACACGCAGTTCGTCTGATCAAAGAAGCTATCGCTCCGTTCAA
CGTACCGGAAGGTATGGTTCAGATCATCGAAGAACCCAGCATCGAGAAGACGCAGGAACTCATGG
GCGCCGTAGACGTAGTAGTTGCTACGGGTGGTATGGGCATGGTGAAGTCTGCATATTCTTCAGGAA
AGCCTTCTTTCGGTGTTGGAGCCGGTAACGTTCAGGTGATCGTGGATAGCAACATCGATTTCGAAGC
TGCTGCAGAAAAAATCATCACCGGTCGTGCTTTCGACAACGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGC
ATCATCTACAACGAGGCTGACAAGGAAGCAGTTTTCACAGCATTCCGCAACCACGGTGCATATTTCT
GTGACGAAGCCGAAGGAGATCGGGCTCGTGCAGCTATCTTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGAT
GTAGTAGGTCAGAGCGTTGCCTTCATTGCCAAGAAAGCAAACATCAATATCCCCGAGGGTACCCGTA
TTCTCGTTGTTGAAGCTCGCGGCGTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAAGATGTGTCCCG
TAATGTGCGCCCTCAGCTACAAGCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCCAA
CGAAGGTAACGGCCACACCTGTGCTATCCACTCCAACAATCAGGCACACATCATCCTCGCAGGATCA
GAGCTGACGGTATCTCGTATCGTAGTGAATGCTCCGAGTGCCACTACAGCAGGCGGTCACATCCAAA
ACGGTCTTGCCGTAACCAATACGCTCGGATGCGGATCATGGGGTAATAACTCTATCTCCGAGAACTT
CACTTACAAGCACCTCCTCAACATTTCACGCATCGCACCGTTGAATTCAAGCATTCACATCCCCGATG
ACAAAGAAATCTGGGAACTCTAA

B.

MEIKEMVSLARKAQKEYQATHNQEAVDNICRAAAKVIYENAAILAREAVDETGMGVYEHKVAKNQGKS
KGVWYNLHNKKSIGILNIDERTGMIEIAKPIGVVGAVTPTTNPIVTPMSNIIFALKTCNAIIIAPHPRSKKCS
AHAVRLIKEAIAPFNVPEGMVQIIEEPSIEKTQELMGAVDVVVATGGMGMVKSAYSSGKPSFGVGAGN
VQVIVDSNIDFEAAAEKIITGRAFDNGIICSGEQSIIYNEADKEAVFTAFRNHGAYFCDEAEGDRARAAIFE
NGAIAKDVVGQSVAFIAKKANINIPEGTRILVVEARGVGAEDVICKEKMCPVMCALSYKHFEEGVEIARTN
LANEGNGHTCAIHSNNQAHIILAGSELTVSRIVVNAPSATTAGGHIQNGLAVTNTLGCGSWGNNSISENF
TYKHLLNISRIAPLNSSIHIPDDKEIWEL

Fig.18

A.

ATGCAACTTTTCAAACTCAAGAGTGTAACACATCACTTTGACACTTTTGCAGAATTTGCCAAGGAATT
CTGTCTTGGAGAACGCGACTTGGTAATTACCAACGAGTTCATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGC
CAGCTCCCCTGCCATTTTGTTATGCAGGAGAAATATGGGCAAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGA
ATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCGCGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGT
TATTGACATCTCTAAACTTTTCGTTCTGAAAGGATTAAATGATGTACTCGATGCATTCGACCGCAAAA
TACCTCTTATCAAAGAGAAAGAACTGATCATTGTGCCCACAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGA
CGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAAGCCGTCACACCAAAATGGGATTGGCTGACGATGCCATTGT
TGCAGACCATGCCATCATCATACCTGAACTTCTGAAGAGCTTGCCTTTCCACTTCTACGCATGCAGTG
CAATCGATGCTCTTATCCATGCCATCGAGTCATACGTATCTCCTAAAGCCAGTCCATATTCTCGTCTGT
TCAGTGAGGCGGCTTGGGACATTATCCTGGAAGTATTCAAGAAAATCGCCGAACACGGCCCTGAAT
ACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCAACTATGCCGGTATAGCCTTCGGAAATG
CAGGAGTAGGAGCCGTCCACGCACTATCCTACCCGTTGGGAGGCAACTATCACGTGCCGCATGGAG
AAGCAAACTATCAGTTCTTCACAGAGGTATTCAAAGTATACCAAAAGAAGAATCCTTTCGGCTATAT
AGTCGAACTCAACTGGAAGCTCTCCAAGATACTGAACTGCCAGCCCGAATACGTATATCCGAAGCTG
GATGAACTTCTCGGATGCCTTCTTACCAAGAAACCTTTGCACGAATACGGCATGAAGGACGAAGAG
GTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAAGATTGCTCGCCAACAACTACGTAGAG
CTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTACTAA

B.

MQLFKLKSVTHHFDTFAEFAKEFCLGERDLVITNEFIYEPYMKACQLPCHFVMQEKYGQGEPSDEMMN
NILADIRNIQFDRVIGIGGGTVIDISKLFVLKGLNDVLDAFDRKIPLIKEKELIIVPTTCGTGSEVTNISIAEIKSR
HTKMGLADDAIVADHAIIIPELLKSLPFHFYACSAIDALIHAIESYVSPKASPYSRLFSEAAWDIILEVFKKIAE
HGPEYRFEKLGEMIMASNYAGIAFGNAGVGAVHALSYPLGGNYHVPHGEANYQFFTEVFKVYQKKNPF
GYIVELNWKLSKILNCQPEYVYPKLDELLGCLLTKKPLHEYGMKDEEVRGFAESVLKTQQRLLANNYVELT
VDEIEGIYRRLY

Fig. 19

A.

ATGAAAGACGTATTAGCGGAATATGCCTCCCGAATTGTTTCGGCCGAAGAAGCCGTAAAACATATCA
AAAATGGAGAACGGGTAGCTTTGTCACATGCTGCCGGAGTTCCTCAGAGTTGTGTTGATGCACTGGT
ACAACAGGCCGACCTTTTCCAGAATGTCGAAATTTATCACATGCTTTGTCTCGGCGAAGGAAAATAT
ATGGCACCTGAAATGGCCCCTCACTTCCGACACATAACCAATTTTGTAGGTGGTAATTCTCGTAAAGC
AGTTGAGGAAAATAGAGCCGACTTCATTCCGGTATTCTTTTATGAAGTGCCATCAATGATTCGCAAA
GACATCCTTCACATAGATGTCGCCATCGTTCAGCTTTCAATGCCTGATGAGAATGGTTACTGTAGTTT
TGGAGTATCTTGCGATTATAGCAAACCGGCAGCAGAAAGCGCTCATTTAGTTATAGGGGAAATCAA
CCGTCAAATGCCATATGTACATGGCGACAACTTGATTCACATATCGAAGTTGGATTACATCGTGATG
GCAGACTACCCTATCTATTCTCTTGCAAAGCCCAAAATCGGAGAAGTAGAAGAAGCTATCGGGCGTA
ATTGTGCCGAGCTTATTGAAGATGGTGCCACACTCCAACTCGGTATCGGCGCGATTCCTGATGCAGC
CCTGTTATTCCTCAAGGACAAAAAAGATCTGGGGATCCATACCGAGATGTTCTCCGATGGTGTTGTC
GAATTAGTTCGCAGTGGAGTAATTACAGGAAAGAAAAAGACACTTCACCCCGGAAAGATGGTCGCA
ACCTTCTTAATGGGAAGCGAAGACGTATATCATTTCATCGACAAAAATCCCGATGTAGAACTTTATCC
GGTAGATTACGTCAATGATCCGCGAGTAATCGCTCAAAATGATAATATGGTCAGCATCAATAGCTGT
ATCGAAATCGATCTTATGGGACAAGTCGTGTCCGAATGTATAGGAAGCAAGCAATTCAGCGGAACC
GGCGGTCAAGTAGATTATGTTCGTGGAGCAGCATGGTCTAAAAACGGCAAAAGCATCATGGCAATT
CCCTCAACAGCCAAAAACGGTACTGCATCTCGAATTGTACCTATAATTGCAGAGGGAGCTGCTGTAA
CAACCCTCCGCAACGAAGTCGATTACGTTGTAACCGAATACGGTATAGCACAACTCAAAGGAAAGA
GTTTGCGCCAGCGAGCAGAAGCTCTTATTGCCATAGCCCACCCGGATTTCAGAGAGGAACTAACGA
AACATCTCCGCAAACGTTTCGGATAA

B.

MKDVLAEYASRIVSAEEAVKHIKNGERVALSHAAGVPQSCVDALVQQADLFQNVEIYHMLCLGEGKYM
APEMAPHFRHITNFVGGNSRKAVEENRADFIPVFFYEVPSMIRKDILHIDVAIVQLSMPDENGYCSFGVS
CDYSKPAAESAHLVIGEINRQMPYVHGDNLIHISKLDYIVMADYPIYSLAKPKIGEVEEAIGRNCAELIEDG
ATLQLGIGAIPDAALLFLKDKKDLGIHTEMFSDGVVELVRSGVITGKKKTLHPGKMVATFLMGSEDVYHFI
DKNPDVELYPVDYVNDPRVIAQNDNMVSINSCIEIDLMGQVVSECIGSKQFSGTGGQVDYVRGAAWSK
NGKSIMAIPSTAKNGTASRIVPIIAEGAAVTTLRNEVDYVVTEYGIAQLKGKSLRQRAEALIAIAHPDFREEL
TKHLRKRFG

Fig.20

A.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTAGCACAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTAAGAGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCAGATGCTATTCTTGTTGGAGACCATGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAAATAGGA
ATGGATGTAAATGATTTTGAAATAGTAAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
AGTAGAGCTTGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTTGTAAATACAGCAA
CTTTCTTAAGATCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGACTTAGAACAGGAAAAACTATGTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATAGACTATTATTTTTAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAGGAAAAAATTGATATAGTAAACAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
CAATAGGAATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATAAACCCTAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACAGAGGACAAATTAAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCTTTAGCACTTGATATAGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AGGGAGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATAGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACTTTAACATATACAACTGATTCAAAAAATGGAGGAATCTTAGT
TGGAACTTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCAAGAGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
CTATAGCACTTGCAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA

B.

MIKSFNEIIMKVKSKEMKKVAVAVAQDEPVLEAVRDAKKNGIADAILVGDHDEIVSIALKIG
MDVNDFEIVNEPNVKKAALKAVELVSTGKADMVMKGLVNTATFLRSVLNKEVGLRTGKTMSH
VAVFETEKFDRLLFLTDVAFNIYPELKEKIDIVNNSVKVAHAIGIENPKVAPICAVEVINPK
MPSTLDAAMLSKMSDRGQIKGCVVDGPLALDIALSEEAAHHKGVTGEVAGKADIFLMPNIET
GNVMYKTLTYTTDSKNGGILVGTSAPVVLTSRADSHETKMNSIALAALVAGNK

Fig.21

A.

ATGTATAGATTACTAATAATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGA
TGAAAAAGAGATATTTGAGAAGACTTTAAGACATTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACA
CTATATTTGATCAATTTCAATTCAGAAAGAATGTAATTTTAGATGCGTTAAAAGAAGCAAAC
ATAGAAGTAAGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGAAGAGGCGGACTCTTAAAGCCAATAGTAAG
TGGAACTTATGCAGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGAGTTCAAGGTCAGC
ATGCGTCAAATCTTGGTGGAATTATTGCAAATGAAATAGCAAAAGAAATAAATGTTCCAGCA
TACATAGTTGATCCAGTTGTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTCAAGAATATCAGGAATGGC
TGACATTCCAAGAAAAAGTATATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTAGAAGATATG
CAAAAGAAGTTGGAAAAAAATACGAAGATCTTAATTTAATCGTAGTCCACATGGGTGGAGGT
ACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGTAGAGTAATAGAAGTTAATAATACACTTGATGGAGA
AGGTCCATTCTCACCAGAAAGAAGTGGTGGAGTTCCAATAGGAGATCTTGTAAGATTGTGCT
TCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAATGAAAAAGATAAACGGCAAAGGCGGAGTTGTT
AGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAGGCTGTAGTTGATAAAGCTCTTGAAGGAGATAAGAA
ATGTGCACTTATATATGAAGCTTTCACATTCCAGGTAGCAAAAGAGATAGGAAAATGTTCAA
CCGTTTTAAAAGGAAATGTAGATGCAATAATCTTAACAGGCGGAATTGCGTACAACGAGCAT
GTATGTAATGCCATAGAGGATAGAGTAAAATTCATAGCACCTGTAGTTAGATATGGTGGAGA
AGATGAACTTCTTGCACTTGCAGAAGGTGGACTTAGAGTTTTAAGAGGAGAAGAAAAAGCTA
AGGAATACAAATAA

B.

MYRLLIINPGSTSTKIGIYDDEKEIFEKTLRHSAEEIEKYNTIFDQFQFRKNVILDALKEAN
IEVSSLNAVVGRGGLLKPIVSGTYAVNQKMLEDLKVGVQGQHASNLGGIIANEIAKEINVPA
YIVDPVVVDELDEVSRISGMADIPRKSIFHALNQKAVARRYAKEVGKKYEDLNLIVVHMGGG
TSVGTHKDGRVIEVNNTLDGEGPFSPERSGGVPIGDLVRLCFSNKYTYEEVMKKINGKGGVV
SYLNTIDFKAVVDKALEGDKKCALIYEAFTFQVAKEIGKCSTVLKGNVDAIILTGGIAYNEH
VCNAIEDRVKFIAPVVRYGGEDELLALAEGGLRVLRGEEKAKEYK

Fig.22

A.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTAGCACAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCAGATGCTATTCTTGTTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAAATAGGC
ATGGATGTAAATGATTTTGAAATAGTAAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
AGTAGAGCTGGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTTGTAAATACAGCAA
CTTTCTTACGCTCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGACTGAGAACAGGAAAAACTATGTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTTAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAGGAAAAAATTGATATCGTAAACAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
CAATAGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATAAACCCTAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACAGAGGACAAATTAAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCGTTAGCACTTGATATCGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AGGGCGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATTGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACTTTAACATATACAACTGATAGCAAAAATGGCGGAATCTTAGT
TGGAACTTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCACGCGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
CTATTGCACTTGCAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA

B.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTAGCACAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCCGATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCTATCGCGCTGAAAATAGGC
ATGGATGTAAATGATTTTGAAATTGTTAACCAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCGTTAAAGGC
AGTAGAGCTGGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTGGTAAATACCGCAA
CTTTCTTACGCTCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGTCTGCGTACAGGAAAAACCATGTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTTAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAGGAAAAAATTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCACATG
CCATTGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATTAACCCGAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACCGCGGACAAATTAAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCGCTGGCACTTGATATCGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AAGGCGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATTGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACGTTAACCTATACCACTGATAGCAAAAATGGCGGCATCCTGGT
TGGAACTTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCACGCGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
CTATTGCACTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAAATAA

Fig.23

C.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTTGCACAAGACGAGCCGGTACTGGAAGCGGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCCGATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTCTCTATCGCGCTGAAAATTGGC
ATGGATGTTAATGATTTTGAAATTGTTAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCGCTGAAGGC
GGTAGAGCTGGTTTCCACCGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAAGGGCTGGTGAATACCGCAA
CTTTCTTACGCAGCGTACTGAACAAAGAAGTTGGTCTGCGTACCGGAAAAACCATGAGTCAC
GTTGCGGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATCGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAAGAAAAAATTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCGCATG
CCATTGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATTAACCCGAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCCGCAATGCTTAGCAAAATGAGTGACCGCGGACAAATTAAAGG
TTGTGTGGTTGACGGCCCGCTGGCACTGGATATCGCGTTAAGCGAAGAAGCGGCACATCATA
AAGGCGTAACCGGCGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCCTGATGCCAAACATTGAAACA
GGCAAIGTAATGTATAAAACGITAACCTATACCACTGATAGCAAAAATGGCGGCATCCTGGT
TGGAACTTCTGCACCAGTTGTTTTAACCTCACGCGCTGACAGCCATGAAACCAAAATGAACA
GCATTGCACTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAAATAA

D.

ATGATTAAAAGTTTTAACGAAATTATCATGAAAGTGAAAAGCAAAGAGATGAAAAAAGTGGC
GGTTGCGGTTGCGCAGGATGAACCGGTGCTGGAAGCGGTGCGCGATGCCAAAAAAAAACGGTA
TTGCCGATGCCATTCTGGTGGGCGATCACGATGAAATTGTCTCTATTGCGCTGAAAATTGGC
ATGGATGTTAACGATTTTGAAATTGTTAATGAACCGAACGTGAAAAAAGCGGCGCTGAAAGC
GGTTGAACTGGTTTCCACCGGTAAAGCCGATATGGTGATGAAAGGGCTGGTGAATACCGCAA
CCTTCCTGCGCAGCGTGCTGAATAAAGAAGTGGGTCTGCGTACCGGTAAAACCATGAGTCAT
GTTGCGGTGTTTGAAACCGAAAAATTTGACCGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCGTTTAA
TACCTATCCGGAACTGAAAGAGAAAATTGATATCGTTAATAACAGCGTGAAAGTGGCGCATG
CCATTGGTATTGAAAACCCGAAAGTGGCGCCGATTTGCGCGGTTGAAGTGATTAACCCGAAA
ATGCCGTCAACGCIGGATGCCGCGATGCTCAGCAAAATGAGCGATCGCGGTCAAATCAAAGG
CTGTGTGGTTGATGGCCCGCTGGCGCTGGATATCGCGCTTAGCGAAGAAGCGGCGCATCATA
AAGGCGTGACCGGCGAAGTGGCCGGTAAAGCCGATATTTTCCTGATGCCGAATATTGAAACC
CGCAACGTGATGTATAAAACGCTGACCTATACCACCGACAGCAAAAACGGCGGCATTCTGGT
GGGTACCAGCGCGCCGGTGGTGCTGACCTCGCGCGCCGACAGCCATGAAACCAAAATGAACA
GCATTGCGCTGGCGGCGCTGGTGGCCGGTAATAAATAA

Fig.23 (tiếp theo)

A.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAGAAGACTTTACGTCATTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTCAGTTCAGAAAGAATGTAATTCTCGATGCGTTAAAAGAAGCAAACATTGAAGTA
AGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGACGCGGCGGACTGTTAAAGCCAATAGTAAGTGGAACTTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGCGTTCAAGGTCAGCATGCGTCAAATCTTG
GTGGAATTATTGCAAATGAAATAGCAAAAGAAATAAATGTTCCAGCATACATCGTTGATCCAGTT
GTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTCACGTATATCAGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
ATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTAGACGCTATGCAAAAGAAGTTGGAAAAAAATACG
AACATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGGTGGCGGTACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGT
AGAGTAATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGAGAAGGTCCATTCTCACCAGAAAGAAGTGGTGG
CGTTCCAATAGGCGATCTTGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAATGA
AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAGGCTGTAGTT
GATAAAGCTCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTTATATATGAAGCTTTCACATTCCAGGTAGC
AAAAGAGATAGGAAAATGTTCAACCGTTTTAAAAGGAAATGTAGATGCAATAATCTTAACAGGCG
GAATTGCGTACAACGAGCATGTATGTAATGCCATAGAGGATAGAGTAAAATTCATTGCACCTGTA
GTTCGTTATGGTGGAGAAGATGAACTTCTTGCACTTGCAGAAGGTGGACTGCGCGTTTTACGCGG
AGAAGAAAAAGCTAAGGAATACAAATAA

B.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAGAAGACGTTACGTCATTCAGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTCAGTTCCGCAAGAATGTGATTCTCGATGCGTTAAAAGAAGCAAACATTGAAGTC
AGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGACGCGGCGGACTGTTAAAGCCAATTGTCAGTGGAACTTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTGGGCGTTCAAGGTCAGCATGCCAGCAATCTTG
GTGGCATTATTGCCAATGAAATCGCAAAAGAAATCAATGTTCCAGCATACATCGTTGATCCGGTT
GTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTAGCCGTATAAGCGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
ATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTCGTCGCTATGCAAAAGAAGTTGGTAAAAAATACG
AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGGTGGCGGTACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGT
CGCGTGATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGCGAAGGTCCATTCTCACCAGAACGTAGTGGTGG
CGTTCCAATTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTGATGA
AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACCTGAATACTATCGATTTTAAGGCTGTAGTT
GATAAAGCGCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTGATTTATGAAGCTTTCACCTTCCAGGTAGC
AAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTTTTAAAAGGAAATGTTGATGCCATTATCTTAACAGGCG
GCATTGCTTACAACGAGCATGTATGTAATGCCATTGAGGATCGCGTAAAATTCATTGCACCTGTA
GTTCGTTATGGTGGCGAAGATGAACTGCTGGCACTGGCAGAAGGTGGACTGCGCGTTTTACGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAGGAATACAAATAA

Fig.24

C.

ATGTATCGTCTGCTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAGAAAACGTTACGTCATAGCGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATTT
TTGATCAATTTCAGTTCCGCAAGAATGTGATTCTCGATGCGCTGAAAGAAGCAAACATTGAAGTC
AGTTCGCTGAATGCGGTAGTTGGTCGCGGCGGTCTGCTGAAGCCAATTGTCAGCGGCACTTATGC
GGTAAATCAAAAAATGCTGGAAGACCTGAAAGTGGGCGTTCAGGGGCAGCATGCCAGCAATCTTG
GTGGCATTATTGCCAATGAAATCGCCAAAGAAATCAATGTTCCGGCATACATCGTTGATCCGGTT
GTTGTGGATGAGCTGGATGAAGTTAGCCGTATCAGCGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
TTTCCATGCACTGAATCAAAAAGCGGTTGCGCGTCGCTATGCAAAAGAAGTTGGTAAAAAATACG
AAGATCTTAATCTGATCGTGGTGCATATGGGTGGCGGTACTAGCGTCGGTACTCATAAAGATGGT
CGCGTGATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGCGAAGGTCCATTCTCACCAGAACGTAGCGGTGG
CGTTCCAATTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACCTATGAAGAAGTGATGA
AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACCTGAATACTATCGATTTTAAGGCGGTAGTT
GATAAAGCGCTGGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTGATTTATGAAGCGTTCACCTTCCAGGTGGC
AAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTTCTGAAAGGCAATGTTGATGCCATTATCCTGACCGGCG
GCATTGCTTACAACGAGCATGTTTGTAATGCCATTGAGGATCGCGTAAAATTCATTGCACCTGTG
GTTCGTTATGGTGGCGAAGATGAACTGCTGGCACTGGCAGAAGGTGGTCTGCGCGTTTTACGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAAGAATACAAATAA

D.

ATGTATCGTCTGCTGATTATCAACCCGGGCAGCACCTCAACCAAAATTGGTATTTACGACGATGA
AAAAGAGATTTTTGAAAAAACGCTGCGTCACAGCGCAGAAGAGATTGAAAAATACAACACCATTT
TCGATCAGTTCCAGTTCCGCAAAAACGTGATTCTCGATGCGCTGAAAGAAGCCAATATTGAAGTC
TCCTCGCTGAATGCGGTGGTCGGTCGCGGCGGTCTGCTGAAACCGATTGTCAGCGGCACTTATGC
GGTTAATCAGAAAATGCTGGAAGATCTGAAAGTGGGCGTGCAGGGGCAGCATGCCAGCAATCTCG
GCGGCATTATCGCCAATGAAATCGCCAAAGAGATCAACGTGCCGGCTTATATCGTCGATCCGGTG
GTGGTTGATGAACTGGATGAAGTCAGCCGTATCAGCGGCATGGCGGATATTCCGCGTAAAAGCAT
TTTCCATGCGCTGAATCAGAAAGCGGTTGCGCGTCGCTATGCCAAAGAAGTGGGTAAAAAATATG
AAGATCTCAATCTGATTGTGGTGCATATGGGCGGCGGCACCAGCGTCGGTACGCATAAAGATGGT
CGCGTGATTGAAGTGAATAACACGCTGGATGGCGAAGGGCCGTTCTCGCCGGAACGTAGCGGCGG
CGTGCCGATTGGCGATCTGGTGCGTCTGTGTTTCAGCAATAAATACACCTACGAAGAAGTGATGA
AAAAAATCAACGGCAAAGGCGGCGTGGTTAGCTATCTGAATACCATCGATTTTAAAGCGGTGGTT
GATAAAGCGCTGGAAGGCGATAAAAAATGCGCGCTGATTTATGAAGCGTTTACCTTCCAGGTGGC
GAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTGCTGAAAGGCAACGTTGATGCCATTATTCTGACCGGCG
GCATTGCTTATAACGAACATGTTTGTAATGCCATTGAAGATCGCGTGAAATTTATTGCGCCGGTG
GTGCGTTACGGCGGCGAAGATGAACTGCTGGCGCTGGCGGAAGGCGGTCTGCGCGTGCTGCGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAAGAGTACAAATAA

Fig.24 (tiếp theo)

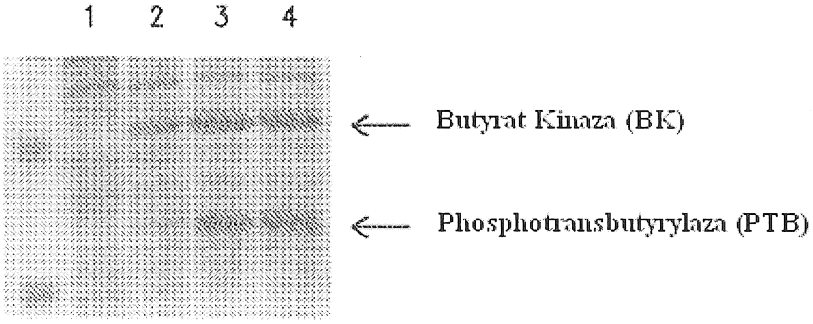


Fig.25A

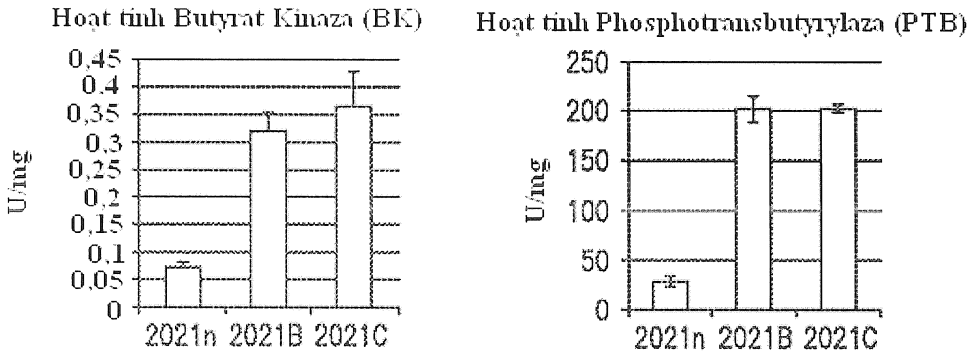


Fig.25B

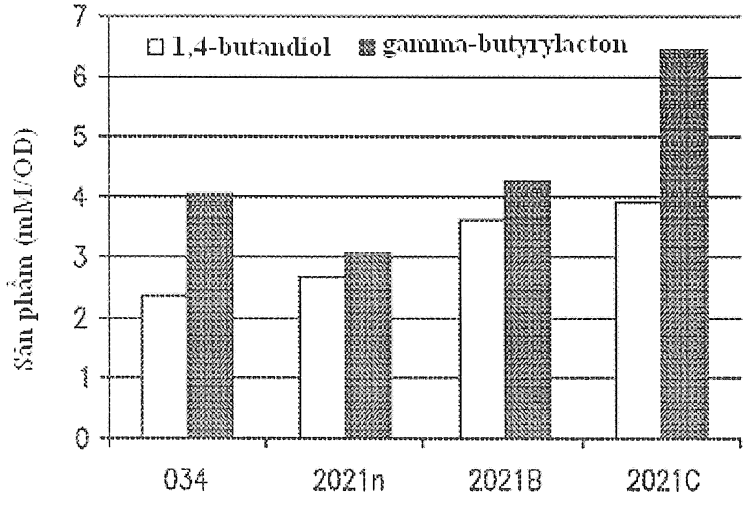


Fig.26

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATTCTTCATGTTTCGGAGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TAAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCCCTTCATTATACAAAAGAGCAAAGAGAAAAA
ATCATAACTGAGATAAGAAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTCTTGGCTACAATGATTCTAGA
AGAAACACATATGGGAAGATATGAGGATAAAATATTAAAACATGAATTGGTAGCTAAATATACTC
CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCTTGGTCAGGTGATAATGGTCTTACAGTTGTAGAAATG
TCTCCATATGGTGTTATAGGTGCAATAACTCCTTCTACGAATCCAACTGAAACTGTAATATGTAA
TAGCATAGGCATGATAGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATTATTTCATGTGGCGGTCCTGAAAATCTA
GTAACAACTATAAAAAATCCAACTATGGAGTCTCTAGATGCAATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
ACTTCTTTGCGGAACTGGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTCTTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
TAGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTAGATGATACTGCTGATATAGAAAAGGCTGGT
AGGAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTGAGAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTATAA
ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATAGATTTAGTATTACAAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
TTTATAAACAAAAAATGGGTAGGAAAAGATGCAAAATTATTCTTAGATGAAATAGATGTTGAGTC
TCCTTCAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAAATCATCCATTTGTTATGACAGAAC
TCATGATGCCAATATTGCCAATTGTAAGAGTTAAAGATATAGATGAAGCTATTAAATATGCAAAG
ATAGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATTCTAAAAATATAGACAACCTAAATAG
ATTTGAAAGAGAAATAGATACTACTATTTTTGTAAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
ATGAAGCAGAAGGATTTACAACTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTGAGGGAATAACCTCTGCA
AGGAATTTTACAAGACAAAGAAGATGTGTACTTGCCGGCTAA

B.

MNKDTLIPTTKDLKVKTNGENINLKNYKDNSSCFGVFENVENAISSAVHAQKILSLHYTKEQREK
IITEIRKAALQNKEVLATMILEETHMGRYEDKILKHELVAKYTPGTEDLTTTAWSGDNGLTVVEM
SPYGVIGAITPSTNPTETVICNSIGMIAAGNAVVFNGHPCAKKCVAFAVEMINKAIISCGGPENL
VTTIKNPTMESLDAIIKHPSIKLLCGTGGPGMVKTLLNSGKKAIGAGAGNPPVIVDDTADIEKAG
RSIIEGCSFDNNLPCIAEKEVFVFENVADDLISNMLKNNAVIINEDQVSKLIDLVLQKNNETQEY
FINKKWVGKDAKLFLDEIDVESPSNVKCIICEVNANHPFVMTELMMPILPIVRVKDIDEAIKYAK
IAEQNRKHSAYIYSKNIDNLNRFEREIDTTIFVKNAKSFAGVGYEAEGFTTFTIAGSTGEGITSA
RNFTRQRRCVLAG

Fig.27

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATTCTTCATGTTTCGGCGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TAAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCCCTTCATTATACAAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATAACTGAGATAAGAAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTCTTGGCTACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAATATTAAAACATGAATTGGTAGCTAAATATACTC
CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCCTGGTCAGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
TCTCCATATGGTGTTATTGGTGCAATAACTCCTTCTACGAATCCAACTGAAACTGTAATATGTAA
TAGCATAGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATTATTTCATGTGGCGGTCCTGAAAATCTG
GTAACAACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCTCTGGATGCAATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
ACTTCTTTGCGGAACTGGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTGTTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
TAGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTCGATGATACTGCTGATATAGAAAAGGCTGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTTGAGAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTATAA
ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATCGATTTAGTATTACAAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
TTTATAAACAAAAAATGGGTAGGAAAAGATGCAAAATTATTCCTCGATGAAATAGATGTTGAGTC
TCCTTCAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAAATCATCCATTTGTTATGACAGAAC
TGATGATGCCAATATTGCCAATTGTACCCGTTAAAGATATCGATGAAGCTATTAAATATGCAAAG
ATAGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATTCTAAAAATATCGACAACCTGAATCG
CTTTGAACGTGAAATAGATACTACTATTTTTGTAAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
ATGAAGCAGAAGGATTTACAACTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTGAGGGAATAACCTCTGCA
CGTAATTTTACACGCCAACGTCGCTGTGTACTTGCCGGCTAA

B.

ATGAATAAAGACACACTGATCCCTACAACTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
TAATTTAAAGAACTACAAAGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TCAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCGCTGCATTATACAAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATCACTGAGATACGTAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTGCTGGCTACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAATATTAAAACATGAACTGGTAGCTAAATATACTC
CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
TCTCCATATGGTGTTATTGGTGCAATAACTCCTTCTACCAATCCAACTGAAACTGTAATTTGTAA
TAGCATTGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAGGCAATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAAAATCTG
GTAACAACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCTCTGGATGCCATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
ACTGCTTTGCGGAACTGGCGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTGTTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
TTGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTCGATGATACTGCTGATATTGAAAAGGCTGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTGAGAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTGAAAAATAATGCTGTAATTATCA
ATGAAGATCAGGTATCAAAATTAATCGATTTAGTATTACAAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
TTTATCAACAAAAAATGGGTAGGTAAAGATGCAAAATTATTCCTCGATGAAATCGATGTTGAGTC
TCCTTCAAATGTTAAATGCATTATCTGCGAAGTGAATGCCAATCATCC

Fig.28

ATTTGTTATGACAGAACTGATGATGCCAATATTGCCAATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAG
CTATTAAATATGCAAAGATTGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATAGCAAAAAT
ATCGACAACCTGAATCGCTTTGAACGTGAAATCGATACTACTATTTTTGTAAAGAATGCTAAATC
TTTTGCTGGTGTTGGTTATGAAGCAGAAGGATTTACCACTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTG
AGGGCATAACCTCTGCACGTAATTTTACCCGCCAACGTCGCTGTGTACTGGCCGGCTAA

C.

ATGAATAAAGACACGCTGATCCCGACAACTAAAGATCTGAAAGTAAAAACCAATGGTGAAAACAT
TAATCTGAAGAACTACAAAGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TCAGCAGCGCGGTACACGCACAAAAGATACTCTCGCTGCATTATACCAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATCACTGAGATCCGTAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTGCTGGCAACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAATACTGAAACATGAACTGGTGGCGAAATATACGC
CTGGTACTGAAGATTTAACCACCACTGCCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACCGTTGTGGAAATG
TCGCCTTATGGTGTTATTGGTGCAATTACGCCTTCAACCAATCCAACTGAAACGGTAATTTGTAA
TAGCATTGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCGGTAGTATTTAACGGTCACCCCTGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAAGCGATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAAAATCTG
GTAACCACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCGCTGGATGCCATTATTAAGCATCCTTCAATCAA
ACTGCTGTGCGGCACTGGCGGTCCAGGAATGGTGAAAACCCTGCTGAATAGCGGTAAGAAAGCGA
TTGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTCGATGATACTGCTGATATTGAAAAAGCGGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTGAGAATGTTGCCGATGATCTGATCTCTAACATGCTGAAAAATAATGCGGTGATTATCA
ATGAAGATCAGGTTAGCAAACTGATCGATCTGGTATTACAAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
TTTATCAACAAAAAATGGGTAGGTAAAGATGCAAAACTGTTCCTCGATGAAATCGATGTTGAGTC
GCCTTCAAATGTTAAATGCATTATCTGCGAAGTGAATGCCAATCATCCATTTGTGATGACCGAAC
TGATGATGCCAATTTTGCCGATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAGCGATTAAATATGCAAAG
ATTGCAGAACAAAATCGTAAACATAGTGCCTATATTTATAGCAAAAATATCGACAACCTGAATCG
CTTTGAACGTGAAATCGATACCACTATTTTTGTGAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
ATGAAGCAGAAGGTTTTACCACTTTCACTATTGCTGGAAGCACCGGTGAAGGCATTACCTCTGCA
CGTAATTTTACCCGCCAACGTCGCTGTGTACTGGCCGGCTAA

D.

ATGAATAAAGATACGCTGATCCCGACCACCAAAGATCTGAAAGTGAAAACCAACGGCGAAAATAT
CAACCTGAAAAACTATAAAGATAACAGCAGTTGCTTTGGCGTGTTTGAAAACGTTGAAAACGCCA
TCTCCAGCGCGGTGCATGCGCAAAAAATTCTCTCGCTGCATTACACCAAAGAGCAGCGTGAAAAA
ATTATCACCGAAATCCGTAAAGCGGCGCTGCAAAACAAAGAAGTGCTGGCAACCATGATCCTGGA
AGAAACGCATATGGGGCGTTATGAAGATAAAATTCTGAAACATGAACTGGTGGCGAAATACACGC
CGGGCACTGAAGATCTGACCACCACCGCCTGGAGCGGCGATAACGGCCTGACCGTGGTGGAGATG
TCGCCTTATGGCGTGATTGGCGCGATTACGCCGTCAACCAACCCGACCGAAACGGTGATTTGTAA
CAGCATTGGCATGATTGCCGCGGGTAATGCGGTGGTGTTTAACGGTCATCCCTGCGCGAAAAAAT
GTGTGGCGTTTGCCGTTGAGATGATCAACAAAGCGATTATCAGCTGCGGCGGCCCGGAAAATCTG
GTGACCACCATCAAAAATCCGACCATGGAATCGCTGGATGCCATTATCAAACATCCTTCCATCAA
ACTGCTGTGCGGCACCGGCGGCCCGGGCATGGTGAAAACGCTGCTGAACAGCGGTAAAAAAGCGA
TTGGCGCGGGCGCGGGTAACCCGCCGGTGATTGTCGATGACACCGCCGATATT

Fig.28 (tiếp theo)

GAAAAAGCGGGGCGTAGCATTATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAACAACCTGCCCTGCATTGCCGA
AAAAGAAGTGTTTGTCTTTGAAAACGTCGCCGATGATCTGATCAGCAATATGCTGAAAAACAACG
CGGTGATTATCAATGAAGATCAGGTTAGCAAACTGATCGATCTGGTGCTGCAAAAAAACAACGAA
ACGCAGGAATATTTTATCAACAAAAAATGGGTTGGTAAAGATGCCAAACTGTTTCTCGATGAAAT
CGATGTTGAATCGCCGTCTAACGTGAAATGTATTATCTGCGAAGTGAACGCCAACCATCCGTTTG
TGATGACCGAACTGATGATGCCGATTCTGCCGATTGTGCGCGTGAAAGATATCGATGAAGCGATT
AAATATGCCAAAATTGCCGAACAAAACCGTAAACACAGCGCCTATATTTACAGCAAAAATATCGA
TAACCTGAACCGCTTTGAACGTGAAATCGATACCACCATTTTTGTGAAAAATGCCAAAAGTTTTG
CCGGCGTTGGTTATGAAGCGGAAGGTTTTACCACCTTTACCATTGCCGGTAGCACCGGCGAAGGC
ATTACCAGCGCCCGTAATTTTACCCGCCAGCGTCGCTGCGTGCTGGCGGGCTAA

Fig.28 (tiếp theo)

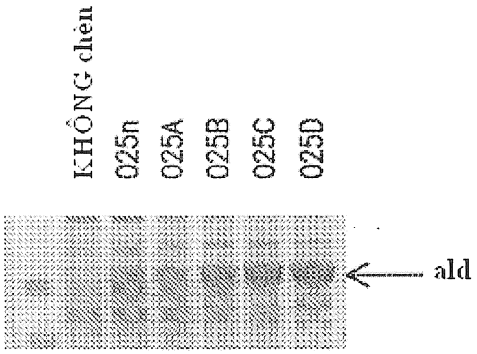


Fig.29

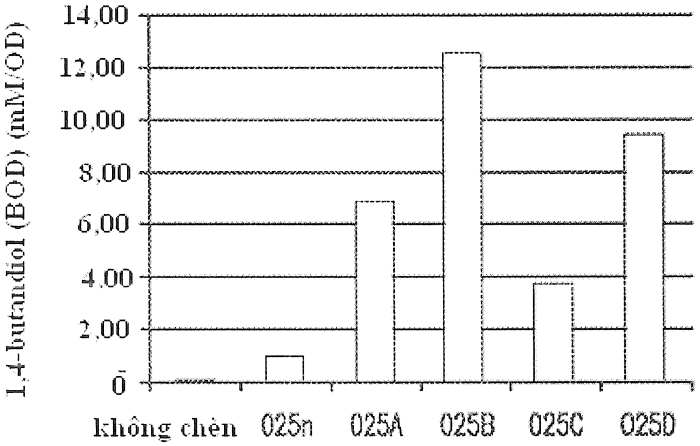


Fig.30A

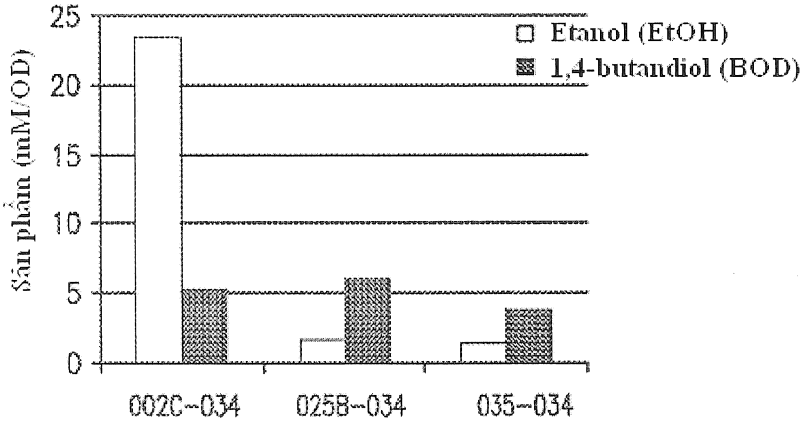


Fig.30B

A.

ATGAAAGCTGCAGTAGTAGAGCAATTTAAGGAACCATTAAAAATTAAAGAAGTGGAAAAGCCATC
TATTTCATATGGCGAAGTATTAGTCCGCATTAAAGCATGCGGTGTATGCCATACGGACTTGCACG
CCGCTCATGGCGATTGGCCAGTAAAACCAAAACTTCCTTTAATCCCTGGCCATGAAGGAGTCGGA
ATTGTTGAAGAAGTCGGTCCGGGGGTAACCCATTTAAAAGTGGGAGACCGCGTTGGAATTCCTTG
GTTATATTCTGCGTGCGGCCATTGCGAATATTGTTTAAGCGGACAAGAAGCATTATGTGAACATC
AACAAAACGCCGGCTACTCAGTCGACGGGGGTTATGCAGAATATTGCAGAGCTGCGCCAGATTAT
GTGGTGAAAATTCCTGACAACTTATCGTTTGAAGAAGCTGCTCCTATTTTCTGCGCCGGAGTTAC
TACTTATAAAGCGTTAAAAGTCACAGGTACAAAACCGGGAGAATGGGTAGCGATCTATGGCATCG
GCGGCCTTGGACATGTTGCCGTCCAGTATGCGAAAGCGATGGGGCTTCATGTTGTTGCAGTGGAT
ATCGGCGATGACAAACTGGAACTTGCAAAAGACCTTGCCGCCCATCTTGTTGTAAATCCTGCAAA
AGAAAATGCCGCCCAATTTATGAAAGAGAAAGTCGGCGGAGTACACGCGGCTGTTGTGACAGCTG
TATCTAAACCTGCTTTTCAATCTGCGTACAATTCTATCCGCAGAGGCGGCACGTGCGTGCTTGTC
GGATTACCGCCGGAAGAAATGCCTATTCCAATCTTTGATACGGTATTAAACGGAATTAAAATTAT
CGGTTCCATTGTCGGCACGCGGAAAGACTTGCAAGAAGCGCTTCAGTTCGCTGCAGAAGGTAAAG
TAAAAACCATTATTGAAGTGCAACCTCTTGAAAAAATTAACGAAGTATTTGACAGAATGCTAAAA
GGAGAAATTAACGGACGGGTTGTTTTAACGTTAGAAAATAATAATTAA

B.

MKAAVVEQFKEPLKIKEVEKPSISYGEVLVRIKACGVCHTDLHAAHGDWPVKPKLPLIPGHEGVG
IVEEVGPGVTHLKVGDRVGIPWLYSACGHCEYCLSGQEALCEHQQNAGYSVDGGYAEYCRAAPDY
VVKIPDNLSFEEAAPIFCAGVTTYKALKVTGTKPGEWVAIYGIGGLGHVAVQYAKAMGLHVVAVD
IGDEKLELAKELGADLVVNPAKENAAQFMKEKVGGVHAAVVTAVSKPAFQSAYNSIRRGGTCVLV
GLPPEEMPIPIFDTVLNGIKIIGSIVGTRKDLQEALQFAAEGKVKTIIEVQPLEKINEVFDRMLK
GEINGRVVLTLENNN

Fig.31

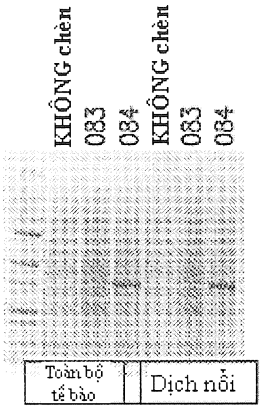


Fig.32A

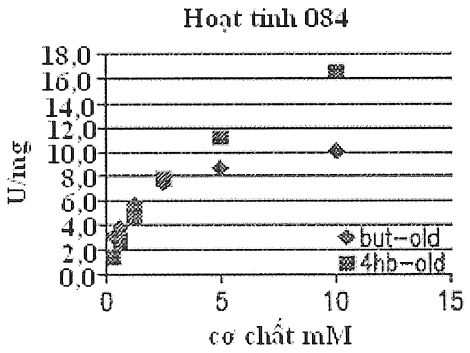


Fig.32B

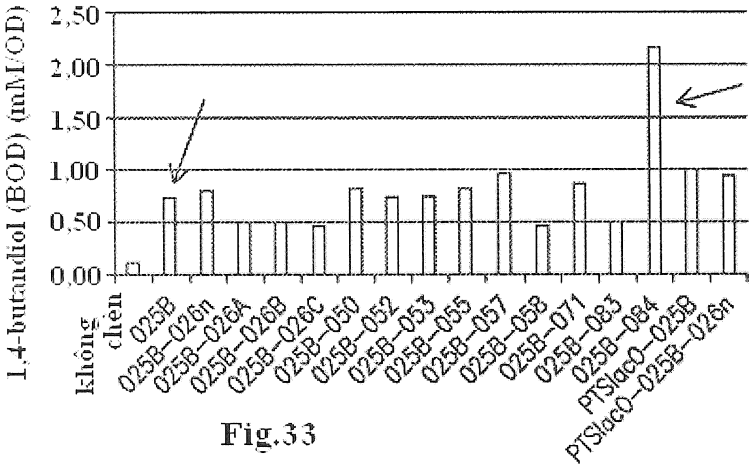


Fig.33

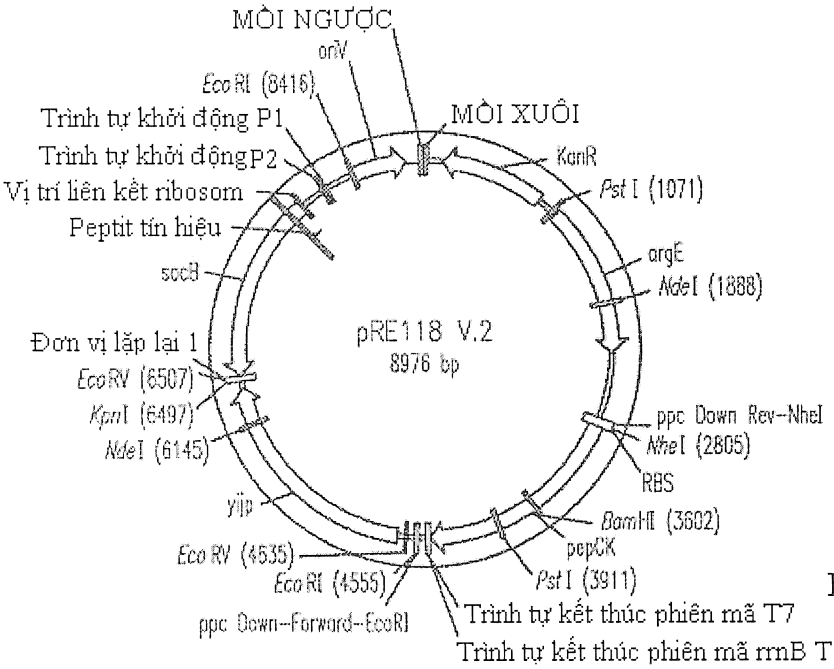


Fig.34

A.

aTGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGGCTGATGAAGTTGAAATCACCGAGATCCTGGTC
AAAGTGGGCGACAAAGTTGAAGCCGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAAGCCTCTATG
GAAGTTCCGTCTCCGCAGGCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTTGGCGATAAAACCCAG
ACCGGCGCACTGATTATGATTTTCGATTCCGCCGACGGTGCAGCAGACGCTGCACCTGCTCAGGCAG
AAGAGAAGAAAGAAGCAGCTCCGGCAGCAGCACCAGCGGCTGCGGCGGCAAAAGACGTTAACGTT
CCGGATATCGGCAGCGACGAAGTTGAAGTGACCGAAATCCTGGTGAAAGTTGGCGATAAAGTTGAA
GCTGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAGGCTTCTATGGAAGTTCCGGCTCCGTTTGCTG
GCACCGTGAAAGAGATCAAAGTGAACGTGGGTGACAAAGTGTCTACCGGCTCGCTGATTATGGTCT
TCGAAGTCGCGGGTGAAGCAGGCGCGGCAGCTCCGGCCGCTAAACAGGAAGCAGCTCCGGCAGCG
GCCCCTGCACCAGCGGCTGGCGTGAAAGAAGTTAACGTTCCGGATATCGGCGGTGACGAAGTTGAA
GTGACTGAAGTGATGGTGAAAGTGGGCGACAAAGTTGCCGCTGAACAGTCACTGATCACCGTAGAA
GGCGACAAAGCTTCTATGGAAGTTCCGGCGCCGTTTGCAGGCGTCGTGAAGGAACTGAAAGTCAAC
GTTGGCCATAAAGTGAAAACTGGCTCGCTGATTATGATCTTCGAAGTTGAAGGCGCAGCGCCTGCG
GCAGCTCCTGCGAAACAGGAAGCGGCAGCGCCGGCACCGGCAGCAAAAGCTGAAGCCCCGGCAGC
AGCACCAGCTGCGAAAGCGGAAGGCAAATCTGAATTTGCTGAAAACGACGCTTATGTTCACGCGAC
TCCGCTGATCCGCCGTCTGGCACGCGAGTTTGGTGTTAACCTTGCGAAAGTGAAGGGCACTGGCCG
TAAAGGTCGTATCCTGCGCGAAGACGTTCAGGCTTACGTGAAAGAAGCTATCAAACGTGCAGAAGC
AGCTCCGGCAGCGACTGGCGGTGGTATCCCTGGCATGCTGCCGTGGCCGAAGGTGGACTTCAGCAA
GTTTGGTGAAATCGAAGAAGTGGAACTGGGCCGCATCCAGAAAATCTCTGGTGCGAACCTGAGCCG
TAACTGGGTAATGATCCCGCATGTTACTCACTTCGACAAAACCGATATCACCGAGTTGGAAGCGTTC
CGTAAACAGCAGAACGAAGAAGCGGCGAAACGTAAGCTGGATGTGAAGATCACCCCGGTTGTCTTC
ATCATGAAAGCCGTTGCTGCAGCTCTTGAGCAGATGCCTCGCTTCAATAGTTCGCTGTCGGAAGACG
GTCAGCGTCTGACCCTGAAGAAATACATCAACATCGGTGTGGCGGTGGATACCCCGAACGGTCTGG
TTGTTCCGGTATTCAAAGACGTCAACAAGAAAGGCATCATCGAGCTGTCTCGCGAGCTGATGACTAT
TTCTAAGAAAGCGCGTGACGGTAAGCTGACTGCGGGCGAAATGCAGGGCGGTTGCTTCACCATCTC
CAGCATCGGCGGCCTGGGTACTACCCACTTCGCGCCGATTGTGAACGCGCCGGAAGTGGCTATCCTC
GGCGTTTCCAAGTCCGCGATGGAGCCGGTGTGGAATGGTAAAGAGTTCGTGCCGCGTCTGATGCTG
CCGATTTCTCTCTCCTTCGACCACCGCGTGATCGACGGTGCTGATGGTGCCCGTTTCATTACCATCATT
AACAACACGCTGTCTGACATTCGCCGTCTGGTGATGTAAGTAAAAGAGCCGGCCCAACGGCCGGCT
TTTTTCTGGTAATCTCATGAATGTATTGAGGTTATTAGCGAATAGACAAATCGGTTGCCGTTTGTTGT
TTAAAAATTGTTAACAATTTTGTAAAATACCGACGGATAGAACGACCCGGTGGTGGTTAGGGTATTA
CTTCACATACCCTATGGATTTCTGGGTGCAGCAAGGTAGCAAGCGCCAGAATCCCCAGGAGCTTACA
TAAGTAAGTGACTGGGGTGAGGGCGTGAAGCTAACGCCGCTGCGGCCTGAAAGACGACGGGTATG
ACCGCCGGAGATAAATATATAGAGGTCATGATGAGTACTGAAATCAAAACTCAGGTCGTGGTACTT
GGGGCAGGCCCCGCAGGTTACTCCGCTGCCTTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAAACCGTAATCG
TAGAACGTTACAACACCCTTGGCGGTGTTTGTCTGAACGTGGGTTGTATCCCTTCTAAAGCGCTGCT
GCACGTGGCAAAAGTTATCGAAGAAGCGAAAGCGCTGGCCGAACACGGCATCGTTTTCGGCGAACC
GAAAACTGACATTGACAAGATCCGCACCTGGAAAGAAAAAGTCATCACTCAGCTGACCGGTGGTCT
GGCTGGCATGGCCAAAGGTCGTAAAGTGAAGGTGGTTAACGGTCTGGGTAAATTTACCGGCGCTAA
CACCCTGGAAGTGGAAGGCGAAAACGGCAAAACCGTGATCAACTTCGACAACGCCATCATCGCGGC
GGGTTCCCGTCCGATTCAGCTGCCGTTTATCCCGCATGAAGATCCGCGCGTATGGGACTCCACCGAC
GCGCTGGAACTGAAATCTGTACCGAAACGCATGCTGGTGATGGGCGGCGGTATCATCGGTCTGGAA
ATGGGTACCGTATACCATGCGCTGGGTTCAGAGATTGACGTGGTGGAAATGTTCGACCAGGTTATC
CCGGCTGCCGACAAAGACGTGGTGAAAGTCTTCACCAAACGCATCAGCAAGAAATTTAACCTGATG
CTGGAAGCCAAAGTGACTGCCGTTGAAGCGAAAGAAGACGGTATTTACGTTTCCATGGAAGGTAAA
AAAGCACCGGCGGAAGCGCAGCGTTACGACGCAGTGCTGGTCGCTATCGGCCGCGTACCGAATGGT

Fig.35

AAAAACCTCGATGCAGGTAAAGCTGGCGTGGAAGTTGACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAAA
CAAATGCGCACCAACGTGCCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCGC
ACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAGTTATCTCCGGTCTGAAACACTACTTCGATCC
GAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACACTAAACCAGAAGTGGCATGGGTCGGTCTGACCGAGAAAGA
AGCGAAAGAGAAAGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCGTGCTAT
CGCTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAACTGATCTTCGACAAAGAGACCCACCGTGTTATCGGC
GGCGCGATTGTCGGCACCAACGGCGGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGGG
CTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCCTG
GCGGCGGAAGTGTTCGAAGGCAGCATCACCGACCTGCCAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAACT
TTTTCTTTCAGGAAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGGAGCCGCTTTTTTTATGCCTGATGTTTAGAACTA
TGTCACTGTTCATAAACCGCTACACCTCATACATACTTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACA
CTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGCACATCCGGCAATTAAAAAAGCGGCTAACCACGCCGCTTT
TTTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTCCACGTTCAGAGAGACGTTCGCATACTGCTGA
CCGTTGCTCGTTATTCAGCCTGACAGTATGGTTACTGTCGTTTAGACGTTGTGGGCGGCTCTCCTGAA
CTTTCTCCCGAAAAACCTGACGTTGTTCAGGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCGTTATCACG
TTGCTGTTGATTCAGTGGGCGCTGCTGTACTTTTTCCTT

Fig.35 (tiếp theo)

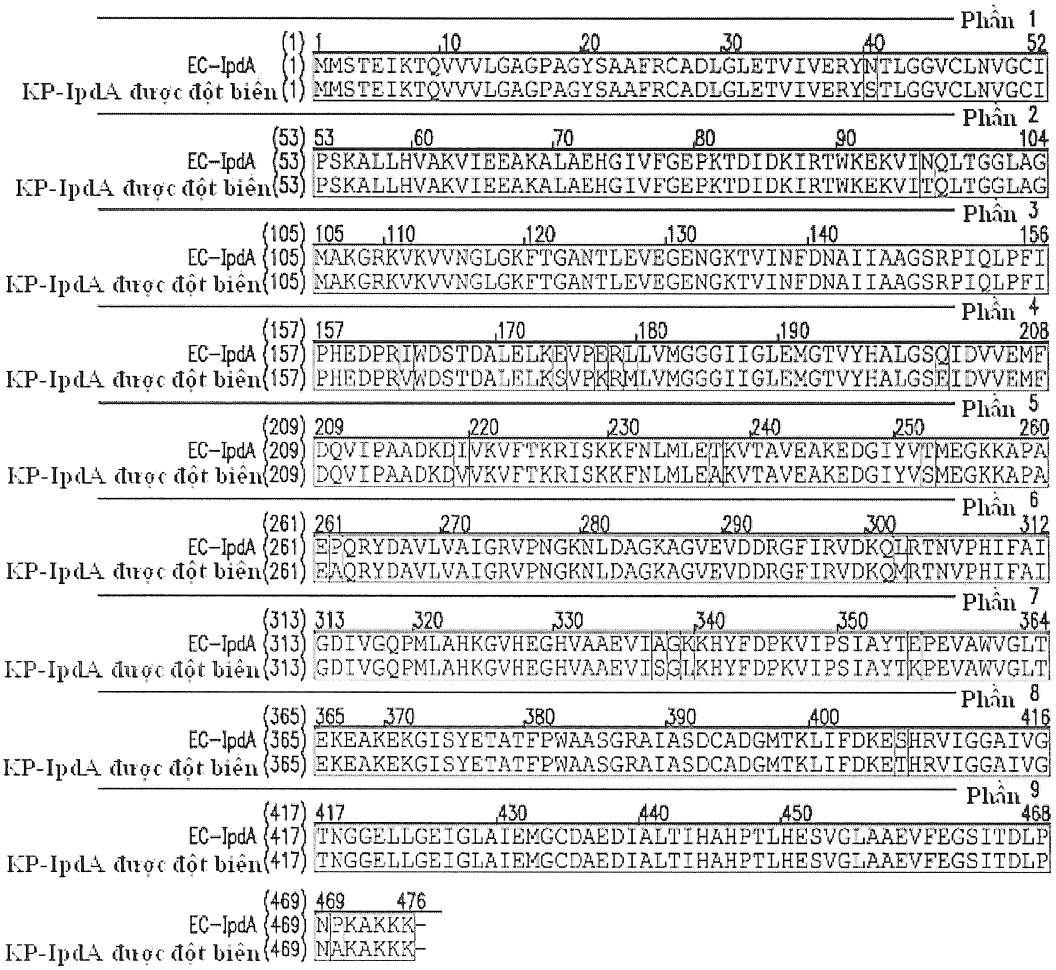

Phần 1
EC-IpdA
KP-IpdA được đột biến
Phần 2
EC-IpdA
KP-IpdA được đột biến
Phần 3
EC-IpdA
KP-IpdA được đột biến
Phần 4
EC-IpdA
KP-IpdA được đột biến
Phần 5
EC-IpdA
KP-IpdA được đột biến
Phần 6
EC-IpdA
KP-IpdA được đột biến
Phần 7
EC-IpdA
KP-IpdA được đột biến
Phần 8
EC-IpdA
KP-IpdA được đột biến
Phần 9
EC-IpdA
KP-IpdA được đột biến

Fig.36

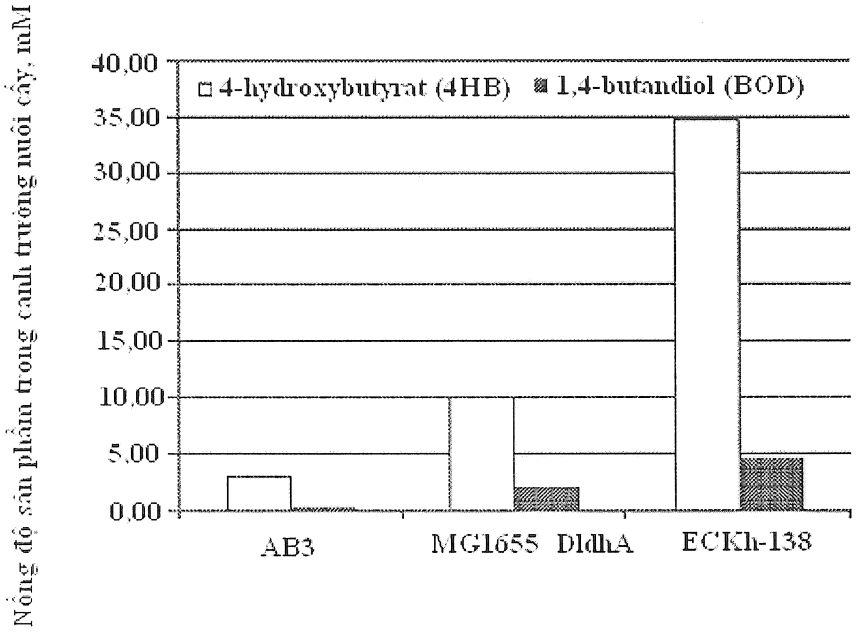


Fig.37

*ataataatacatatgaaccat*gcgagttacgggcctataagccaggcgagatatgatctatatcaatttctcatctataatgctttgtta
gtatctcgtcgccgacttaataaagagagagttagtgtgaaagctgacaacccttttgatcttttacttcctgctgcaatggccaaagtgg
ccgaagaggcgggtgtctataaagcaacgaaacatccgcttaagactttctatctggcgattaccgccggtgttttcatctcaatcgcattc
accactggcacaggcacaGAAGGTAGGTGTTACatgtcagaacgtttacaca*atgacgtggatcctattattat*

Fig.38

AAGAGGTAAAAGAATAATGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGGCTGATGAAGTTGAAAT
CACCGAGATCCTGGTCAAAGTGGGCGACAAAGTTGAAGCCGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGG
CGACAAAGCCTCTATGGAAGTTCCGTCTCCGCAGGCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTT
GGCGATAAAACCCAGACCGGCGCACTGATTATGATTTTCGATTCCGCCGACGGTGCAGCAGACGCT
GCACCTGCTCAGGCAGAAGAGAAGAAAGAAGCAGCTCCGGCAGCAGCACCAGCGGCTGCGGCGGC
AAAAGACGTTAACGTTCCGGATATCGGCAGCGACGAAGTTGAAGTGACCGAAATCCTGGTGAAAGT
TGGCGATAAAGTTGAAGCTGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAGGCTTCTATGGAAGT
TCCGGCTCCGTTTGCTGGCACCGTGAAAGAGATCAAAGTGAACGTGGGTGACAAAGTGTCTACCGG
CTCGCTGATTATGGTCTTCGAAGTCGCGGGTGAAGCAGGCGCGGCAGCTCCGGCCGCTAAACAGGA
AGCAGCTCCGGCAGCGGCCCCTGCACCAGCGGCTGGCGTGAAAGAAGTTAACGTTCCGGATATCGG
CGGTGACGAAGTTGAAGTGACTGAAGTGATGGTGAAAGTGGGCGACAAAGTTGCCGCTGAACAGT
CACTGATCACCGTAGAAGGCGACAAAGCTTCTATGGAAGTTCCGGCGCCGTTTGCAGGCGTCGTGA
AGGAACTGAAAGTCAACGTTGGCGATAAAGTGAAAACTGGCTCGCTGATTATGATCTTCGAAGTTG
AAGGCGCAGCGCCTGCGGCAGCTCCTGCGAAACAGGAAGCGGCAGCGCCGGCACCGGCAGCAAAA
GCTGAAGCCCCGGCAGCAGCACCAGCTGCGAAAGCGGAAGGCAAATCTGAATTTGCTGAAAACGA
CGCTTATGTTCACGCGACTCCGCTGATCCGCCGTCTGGCACGCGAGTTTGGTGTTAACCTTGCGAAA
GTGAAGGGCACTGGCCGTAAAGGTCGTATCCTGCGCGAAGACGTTCAGGCTTACGTGAAAGAAGCT
ATCAAACGTGCAGAAGCAGCTCCGGCAGCGACTGGCGGTGGTATCCCTGGCATGCTGCCGTGGCCG
AAGGTGGACTTCAGCAAGTTTGGTGAAATCGAAGAAGTGGAACTGGGCCGCATCCAGAAAATCTCT
GGTGCGAACCTGAGCCGTAACTGGGTAATGATCCCGCATGTTACTCACTTCGACAAAACCGATATCA
CCGAGTTGGAAGCGTTCCGTAAACAGCAGAACGAAGAAGCGGCGAAACGTAAGCTGGATGTGAAG
ATCACCCCGGTTGTCTTCATCATGAAAGCCGTTGCTGCAGCTCTTGAGCAGATGCCTCGCTTCAATAG
TTCGCTGTCGGAAGACGGTCAGCGTCTGACCCTGAAGAAATACATCAACATCGGTGTGGCGGTGGA
TACCCCGAACGGTCTGGTTGTTCCGGTATTCAAAGACGTCAACAAGAAAGGCATCATCGAGCTGTCT
CGCGAGCTGATGACTATTTCTAAGAAAGCGCGTGACGGTAAGCTGACTGCGGGCGAAATGCAGGG
CGGTTGCTTCACCATCTCCAGCATCGGCGGCCTGGGTACTACCCACTTCGCGCCGATTGTGAACGCG
CCGGAAGTGGCTATCCTCGGCGTTTCCAAGTCCGCGATGGAGCCGGTGTGGAATGGTAAAGAGTTC
GTGCCGCGTCTGATGCTGCCGATTTCTCTCTCCTTCGACCACCGCGTGATCGACGGTGCTGATGGTG
CCCGTTTCATTACCATCATTAACAACACGCTGTCTGACATTCGCCGTCTGGTGATGTAAGTAAAAGAG
CCGGCCCAACGGCCGGCTTTTTTCTGGTAATCTCATGAATGTATTGAGGTTATTAGCGAATAGACAA
ATCGGTTGCCGTTTGTTAAGCCAGGCGAGATATGATCTATATCAATTTCTCATCTATAATGCTTTGTTA
GTATCTCGTCGCCGACTTAATAAAGAGAGAGTTAGTCTTCTATATCACAGCAAGAAGGTAGGTGTTA
CATGATGAGTACTGAAATCAAAACTCAGGTCGTGGTACTTGGGGCAGGCCCCGCAGGTTACTCTGC
AGCCTTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAAACCGTCATCGTAGAACGTTACAGCACCCTCGGTGGT
GTTTGTCTGAACGTGGGTTGTATCCCTTCTAAAGCGCTGCTGCACGTGGCAAAAGTTATCGAAGAAG
CGAAAGCGCTGGCCGAACACGGCATCGTTTTCGGCGAACCGAAAACTGACATTGACAAGATCCGCA
CCTGGAAAGAAAAAGTCATCACTCAGCTGACCGGTGGTCTGGCTGGCATGGCCAAAGGTCGTAAAG
TGAAGGTGGTTAACGGTCTGGGTAAATTTACCGGCGCTAACACCCTGGAAGTGGAAGGCGAAAACG
GCAAAACCGTGATCAACTTCGACAACGCCATCATCGCGGCGGGTTCCCGTCCGATTCAGCTGCCGTT
TATCCCGCATGAAGATCCGCGCGTATGGGACTCCACCGACGCGCTGGAACTGAAATCTGTACCGAA
ACGCATGCTGGTGATGGGCGGCGGTATCATCGGTCTGGAAATGGGTACCGTATACCATGCGCTGGG
TTCAGAGATTGACGTGGTGGAAATGTTCGACCAGGTTATCCCGGCTGCCGACAAAGACGTGGTGAA
AGTCTTCACCAAACGCATCAGCAAGAAATTTAACCTGATGCTGGAAGCCAAAGTGACTGCCGTTGAA
GCGAAAGAAGACGGTATTTACGTTTCCATGGAAGGTAAAAAAGCACCGGCGGAAGCGCAGCGTTA
CGACGCAGTGCTGGTCGCTATCGGCCGCGTACCGAATGGTAAAACCTCGATGCAGGTAAAGCTGG
CGTGGAAGTTGACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAA

Fig.39

ACAAATGCGCACCAACGTGCCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCG
CACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAGTTATCTCCGGTCTGAAACACTACTTCGATC
CGAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACACTAAACCAGAAGTGGCATGGGTCGGTCTGACCGAGAAAG
AAGCGAAAGAGAAAGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCGTGCTA
TCGCTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAACTGATCTTCGACAAAGAGACCCACCGTGTTATCGG
CGGCGCGATTGTCGGCACCAACGGCGGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGG
GCTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCCT
GGCGGCGGAAGTGTTCGAAGGCAGCATCACCGACCTGCCAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAAC
TTTTTCTTTCAGGAAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGGAGCCGCTTTTTTTATGCCTGATGTTTAGAACT
ATGTCACTGTTCATAAACCGCTACACCTCATACATACTTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCAC
ACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGCACATCCGGCAATTAAAAAAGCGGCTAACCACGCCGCTT
TTTTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTCCACGTTCAGAGAGACGTTCGCATACTGCTG
ACCGTTGCTCGTTATTCAGCCTGACAGTATGGTTACTGTCGTTTAGACGTTGTGGGCGGCTCTCCTGA
ACTTTCTCCCGAAAAACCTGACGTTGTTCAGGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCGTTATCAC
GTTGCTGTTGATTCAGTGGGCGCTGCTGTACTTTTTCCTTAAACACCTGGCGCTGCTCTGGTGATGCG
GACTGAATACGCTCACGCGCTGCGTCTCTTCGCTGCTGGTTCTGCGGGTTAGTCTGCATTTTCTCGCG
AACCGCCTGGCGCTGCTCAGGCGAGGCGGACTGAATGCGCTCACGCGCTGCCTCTCTTCGCTGCTG
GATCTTCGGGTTAGTCTGCATTCTCTCGCGAACTGCCTGGCGCTGCTCAGGCGAGGCGGACTGATAA
CGCTGACGAGCGGCGTCCTTTTGTTGCTGGGTCAGTGGTTGGCGACGGCTGAAGTCGTGGAAGTCG
TCATAGCTCCCATAGTGTTCAGCTTCATTAAACCGCTGTGCCGCTGCCTGACGTTGGGTACCTCGTGT
AATGACTGGTGCGGCGTGTGTTCGTTGCTGAAACTGATTTGCTGCCGCCTGACGCTGGCTGTCGCGC
GTTGGGGCAGGTAATTGCGTGGCGCTCATTCCGCCGTTGACATCGGTTTGATGAAACCGCTTTGCCA
TATCCTGATCATGATAGGGCACACCATTACGGTAGTTTGGATTGTGCCGCCATGCCATATTCTTATCA
GTAAGATGCTCACCGGTGATACGGTTGAAATTGTTGACGTCGATATTGATGTTGTCGCCGTTGTGTT
GCCAGCCATTACCGTCACGATGACCGCCATCGTGGTGATGATAATCAT

Fig.39 (tiếp theo)

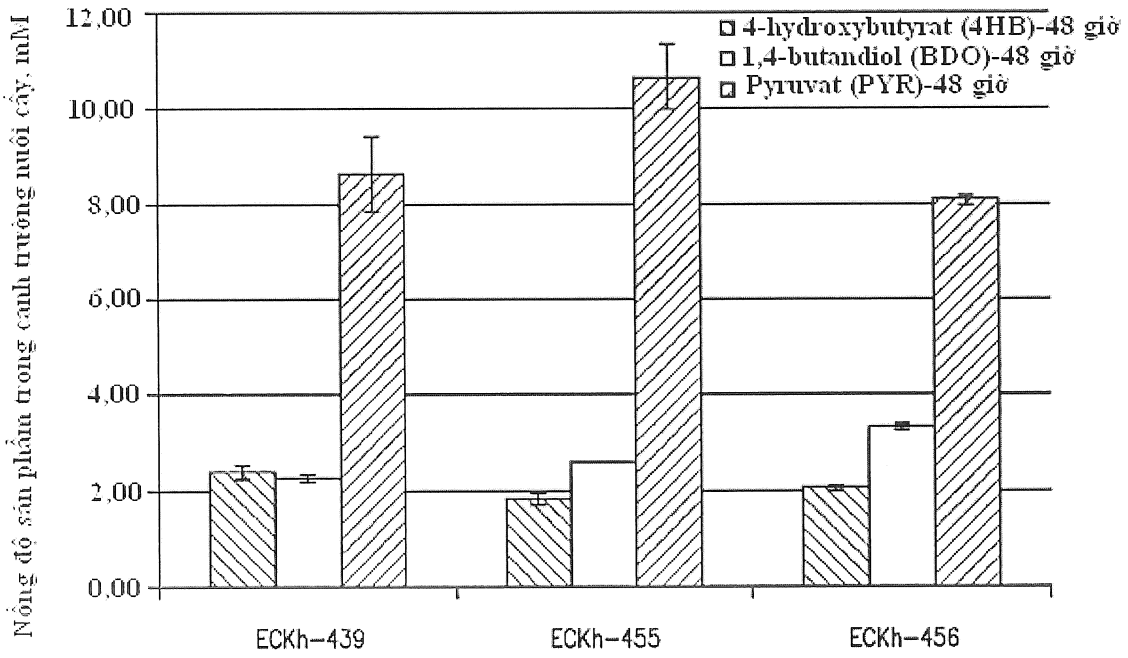


Fig.40

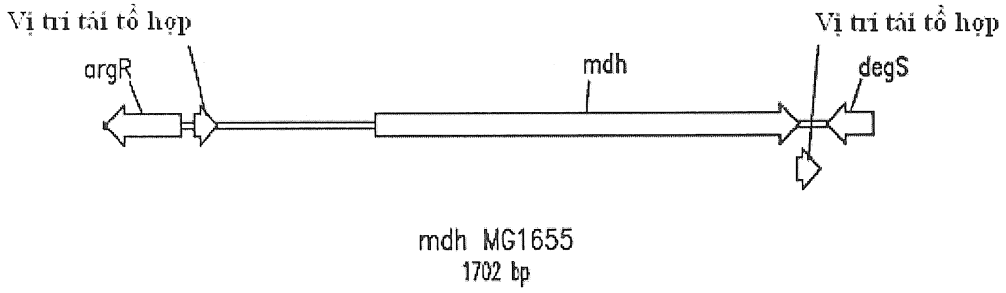


Fig.41A



Fig.41B

TTATTTGGTGATATTGGTACCAATATCATGCAGCAAACGGTGCAACATTGCCGTGTCTCGTTGCTCTA
AAAGCCCCAGGCGTTGTTGTAACCAGTCGACCAGTTTTATGTCATCTGCCACTGCCAGAGTCGTCAG
CAATGTCATGGCTCGTTCGCGTAAAGCTTGCAGTTGATGTTGGTCTGCCGTTGCATCACTTTTCGCCG
GTTGTTGTATTAATGTTGCTAATTGATAGCAATAGACCATCACCGCCTGCCCCAGATTGAGCGAAGG
ATAATCCGCCACCATCGGCACACCAGTAAGAACGTCAGCCAACGCTAACTCTTCGTTAGTCAACCCG
GAATCTTCGCGACCAAACACCAGCGCGGCATGGCTCATCCATGAAGATTTTTCCTCTAACAGCGGCA
CCAGTTCAACTGGCGTGGCGTAGTAATGATATTTCGCCCGACTGCGCGCAGTGGTGGCGACAGTGA
AATCGACATCGTGTAACGATTCAGCCAATGTCGGGAAAACTTTAATATTATCAATAATATCACCAGAT
CCATGTGCGACCCAGCGGGTGGCTGGCTCCAGGTGTGCCTGACTATCGACAATCCGCAGATCGCTA
AACCCCATCGTTTTCATTGCCCGCGCCGCTGCCCCAATATTTTCTGCTCTGGCGGGTGCGACCAGAAT
AATCGTTATACGCATATTGCCACTCTTCTTGATCAAATAACCGCGAACCGGGTGATCACTGTCAACTT
ATTACGCGGTGCGAATTTACAAATTCTTAACGTAAGTCGCAGAAAAAGCCCTTTACTTAGCTTAAAAA
AGGCTAAACTATTTCCTGACTGTACTAACGGTTGAGTTGTTAAAAAATGCTACATATCCTTCTGTTTA
CTTAGGATAATTTTATAAAAAATAAATCTCGACAATTGGATTCACCACGTTTATTAGTTGTATGATGC
AACTAGTTGGATTATTAAAATAATGTGACGAAAGCTAGCATTTAGATACGATGATTTCATCAAACTGT
TAACGTGCTACAATTGAACTTGATATATGTCAACGAAGCGTAGTTTTATTGGGTGTCCGGCCCCTCTT
AGCCTGTTATGTTGCTGTTAAAATGGTTAGGATGACAGCCGTTTTTGACACTGTCGGGTCCTGAGGG
AAAGTACCCACGACCAAGCTAATGATGTTGTTGACGTTGATGGAAAGTGCATCAAGAACGCAATTAC
GTACTTTAGTCATGTTACGCCGATCATGTTAATTTGCAGCATGCATCAGGCAGGTCAGGGACTTTTGT
ACTTCCTGTTTCGATTTAGTTGGCAATTTAGGTAGCAAACGAATTCATCGGCTTTACCACCGTCAAAA
AAAACGGCGCTTTTTAGCGCCGTTTTTATTTTTCAACCTTATTTCCAGATACGTAACTCATCGTCCGTT
GTAACTTCTTTACTGGCTTTCATTTTCGGCAGTGAAAACGCATACCAGTCGATATTACGGGTCACAAA
CATCATGCCGGCCAGCGCCACCACCAGCACACTGGTTCCCAACAACAGCGCGCTATCGGCAGAGTTG
AGCAGTCCCCACATCACACCATCCAGCAACAACAGCGCGAGGGTAAACAACATGCTGTTGCACCAAC
CTTTCAATACCGCTTGCAAATAAATACCGTTCATTATCGCCCCAATCAGACTGGCGATTATCCATGCC
ACGGTAAAACCGGTATGTTCAGAAAGCGCCAGCAAGAGCAAATAAAACATCACCAATGAAAGCCCC
ACCAGCAAATATTGCATTGGGTGTAAACGTTGCGCGGTGAGCGTTTCAAAAACAAAGAACGCCATA
AAAGTCAGTGCAATCAGCAGAATGGCGTACTTAGTCGCCCGGTCAGTTAATTGGTATTGATCGGCTG
GCGTCGTTACTGCGACGCTAAACGCCGGGAAGTTTTCCCAGCCGGTATCATTGCCTGAAGCAAAACG
CTCACCGAGATTATTAGCAAACCAGCTGCTTTGCCAGTGCGCCTGAAAACCTGACTCGCTAACTTCCC
GTTTGGCTGGTAGAAAATCACCTAAAAAACTGGGATGCGGCCAGTTGCTGGTTAAGGTCATTTCGCT
ATTACGCCCGCCAGGCACCACAGAAAGATCGCCGGTACCGCTTAAATTCAGGGCCATATTCAGCTTC
AGGTTCTGCTTCCGCCAGTCCCCTTCAGGTAAAGGGATATGCACGCCCTGCCCGCCTTGCTCTAACCC
GGTGCCGGGTTCAATGGTCAGCGCCGTTCCGTTAACTTCAGGCGCTTTCACCACACCAATACCACGC
GCATCCCCCGACGCTAATCACAATAAATGGCTTGCCTAAGGTGATATTTGGCGCGTTGAGTTCGCTAA
GACGCGAAACATCGAAATCGGCTTTTAACGTTAAATCACTGTGCCAGACCTGACCGGTATAAATCCC
TATCTTGCGTTCTTCCACGTTCTGATTGCCATCAACCATCAATGACTCAGGTAACCAAAAATGGATAA
AACTTCGTTTCCGCTGCAGGGTTTTAT

Fig.42

AAGCCACAGCAGGATGCCCACTGCAACAAAGGTGATCACACCGGAAACGCGATGGAGAATGGACG
CTATCGCCGTGATGGGGAACCGGATGGTCTGTAGGTCCAGATTAACAGGTCTTTGTTTTTTCACATTT
CTTATCATGAATAACGCCCACATGCTGTTCTTATTATTCCCTGGGGACTACGGGCACAGAGGTTAACT
TTCTGTTACCTGGAGACGTCGGGATTTCCTTCCTCCGGTCTGCTTGCGGGTCAGACAGCGTCCTTTCT
ATAACTGCGCGTCATGCAAAACACTGCTTCCAGATGCGAAAACGACACGTTACAACGCTGGGTGGCT
CGGGATTGCAGGGTGTTCCGGAGACCTGGCGGCAGTATAGGCTGTTCACAAAATCATTACAATTAA
CCTACATATAGTTTGTCGGGTTTTATCCTGAACAGTGATCCAGGTCACGATAACAACATTTATTTAAT
TTTTAATCATCTAATTTGACAATCATTCAACAAAGTTGTTACAAACATTACCAGGAAAAGCATATAAT
GCGTAAAAGTTATGAAGTCGGTATTTCACCTAAGATTAACTTATGTAACAGTGTGGAAGTATTGACC
AATTCATTCGGGACAGTTATTAGTGGTAGACAAGTTTAATAATTCGGATTGCTAAGTACTTGATTCGC
CATTTATTCGTCATCAATGGATCCTTTACCTGCAAGCGCCCAGAGCTCTGTACCCAGGTTTTCCCCTCT
TTCACAGAGCGGCGAGCCAAATAAAAAACGGGTAAAGCCAGGTTGATGTGCGAAGGCAAATTTAA
GTTCCGGCAGTCTTACGCAATAAGGCGCTAAGGAGACCTTAAATGGCTGATACAAAAGCAAAACTC
ACCCTCAACGGGGATACAGCTGTTGAACTGGATGTGCTGAAAGGCACGCTGGGTCAAGATGTTATT
GATATCCGTACTCTCGGTTCAAAAGGTGTGTTCACCTTTGACCCAGGCTTCACTTCAACCGCATCCTG
CGAATCTAAAATTACTTTTATTGATGGTGATGAAGGTATTTTGCTGCACCGCGGTTTCCCGATCGATC
AGCTGGCGACCGATTCTAACTACCTGGAAGTTTGTTACATCCTGCTGAATGGTGAAAAACCGACTCA
GGAACAGTATGACGAATTTAAAACTACGGTGACCCGTCATACCATGATCCACGAGCAGATTACCCGT
CTGTTCCATGCTTTCCGTCGCGACTCGCATCCAATGGCAGTCATGTGTGGTATTACCGGCGCGCTGG
CGGCGTTCTATCACGACTCGCTGGATGTTAACAATCCTCGTCACCGTGAAATTGCCGCGTTCCTCCTG
CTGTCGAAAATGCCGACCATGGCCGCGATGTGTTACAAGTATTCCATTGGTCAGCCATTTGTTTACCC
GCGCAACGATCTCTCCTACGCCGGTAACTTCCTGAATATGATGTTCTCCACGCCGTGCGAACCGTATG
AAGTTAATCCGATTCTGGAACGTGCTATGGACCGTATTCTGATCCTGCACGCTGACCATGAACAGAA
CGCCTCTACCTCCACCGTGCGTACCGCTGGCTCTTCGGGTGCGAACCCGTTTGCCTGTATCGCAGCA
GGTATTGCTTCACTGTGGGGACCTGCGCACGGCGGTGCTAACGAAGCGGCGCTGAAAATGCTGGAA
GAAATCAGCTCCGTTAAACACATTCCGGAATTTGTTCGTCGTGCGAAAGACAAAAATGATTCTTTCCG
CCTGATGGGCTTCGGTCACCGCGTGTACAAAAATTACGACCCGCGCGCCACCGTAATGCGTGAAACC
TGCCATGAAGTGCTGAAAGAGCTGGGCACGAAGGATGACCTGCTGGAAGTGGCTATGGAGCTGGA
AAACATCGCGCTGAACGACCCGTACTTTATCGAGAAGAAACTGTACCCGAACGTCGATTTCTACTCT
GGTATCATCCTGAAAGCGATGGGTATTCCGTCTTCCATGTTCACCGTCATTTTCGCAATGGCACGTAC
CGTTGGCTGGATCGCCCACTGGAGCGAAATGCACAGTGACGGTATGAAGATTGCCCGTCCGCGTCA
GCTGTATACAGGATATGAAAAACGCGACTTTAAAAGCGATATCAAGCGTTAATGGTTGATTGCTAAG
TTGTAAATATTTTAACCCGCCGTTCATATGGCGGGTTGATTTTTATATGCCTAAACACAAAAAATTGT
AAAAATAAAATCCATTAACAGACCTATATAGATATTTAAAAAGAATAGAACAGCTCAAATTATCAGC
AACCCAATACTTTCAATTAAAAACTTCATGGTAGTCGCATTTATAACCCTATGAAAATGACGTCTATCT
ATACCCCCCTATATTTTATTCATCATACAACAAATTCATGATACCAATAATTTAGTTTTGCATTTAATAA
AACTAACAATATTTTTAAGCAAAACTAAAAACTAGCAATAATCAAATACGATATTCTGGCGTAGCTAT
ACCCCTATTCTATATCCTTAAAGGACTCTGTTATGTTTAAAGGACAAAAAACATTGGCCGCACTGGCC
GTATCTCTGCTGTTCACTGCACCTGTTTATGCTGCTGATGAAGGTTCTGGCGAAATTCACTTTAAGGG
GGAGGTTATTGAAGCACCTTGTGAAATTCATCCAGAAGATATTGATAAAAACATAGATCTTGGACAA
GTCACGACAACCCATATAAACCGGGAGCATCATAGCAATAAAGTGGCCGTCGACATTCGCTTGATCA
ACTGTGATCTGCCTGCTTCTGACAACGGTAGCGGAATGCCGGTATCCAAAGTTGGCGTAACCTTCGA
TAGCACGGCTAAGACAACTGGTGCTACGCCTTTGTTGAGCAACACCAGTGCAGGCGAAGCAACTGG
GGTCGGTGTACGACTGATGGACAAAAATGACGGTAACATCGTATTAGGTTCAGCCGCGCCAGATCT
TGACCTGGATGCAAGCTCATCAGAACAGACGCTGAACTTTTTCGCCTGGAT

Fig.43

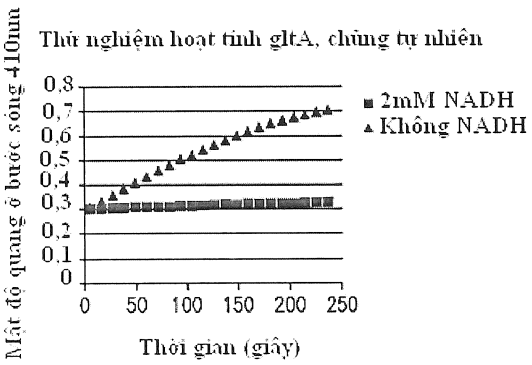


Fig.44A

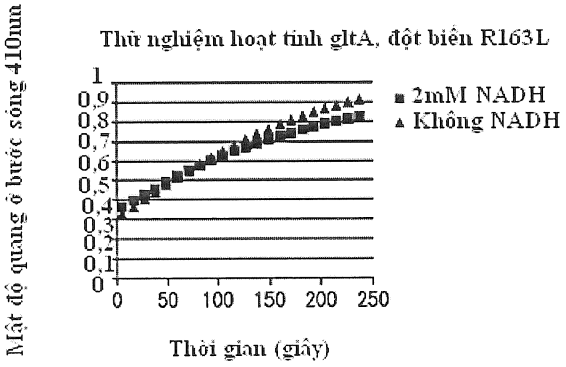


Fig.44B

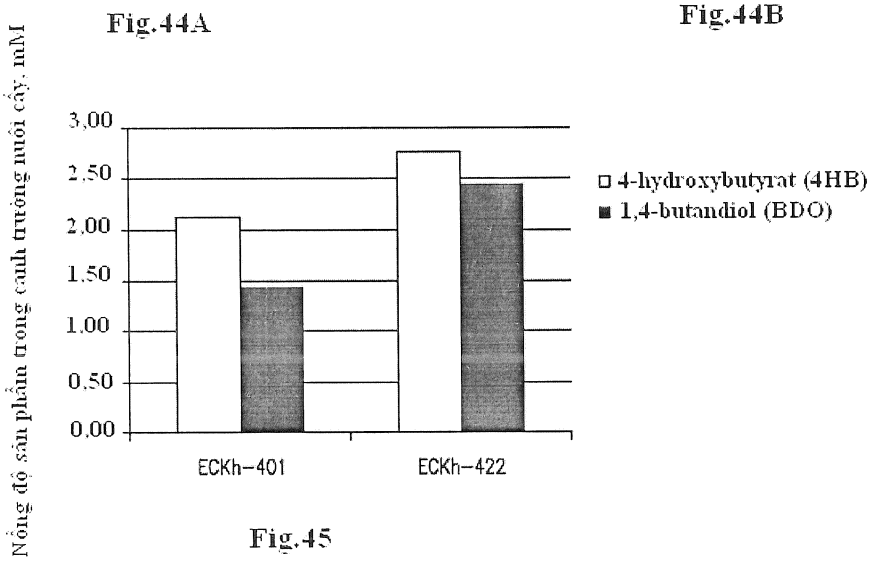


Fig.45

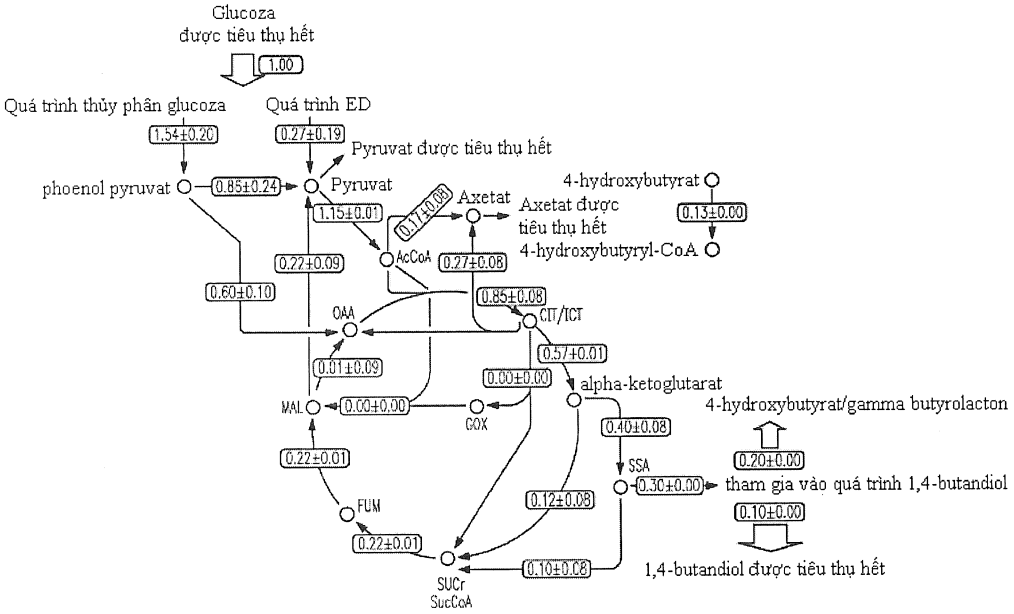


Fig.46

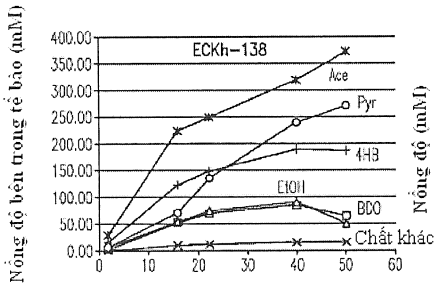


Fig.47A

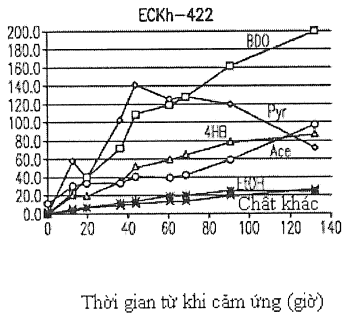


Fig.47B

CGCGATGTCGACGTCACGAAACTGAAAAAACCGCTCTACATTCTGGCGACTGCTGATGAAGAAACC
AGTATGGCCGGAGCGCGTTATTTTGCCGAAACTACCGCCCTGCGCCCGGATTGCGCCATCATTGGCG
AACCGACGTCACTACAACCGGTACGCGCACATAAAGGTCATATCTCTAACGCCATCCGTATTCAGGG
CCAGTCGGGGCACTCCAGCGATCCAGCACGCGGAGTTAACGCTATCGAACTAATGCACGACGCCAT
CGGGCATATTTTGCAATTGCGCGATAACCTGAAAGAACGTTATCACTACGAAGCGTTTACCGTGCCA
TACCCTACGCTCAACCTCGGGCATATTCACGGTGGCGACGCTTCTAACCGTATTTGCGCTTGCTGTGA
GTTGCATATGGATATTCGTCCGCTGCCTGGCATGACACTCAATGAACTTAATGGTTTGCTCAACGATG
CATTGGCTCCGGTGAGCGAACGCTGGCCGGGTCGTCTGACGGTCGACGAGCTGCATCCGCCGATCC
CTGGCTATGAATGCCCACCGAATCATCAACTGGTTGAAGTGGTTGAGAAATTGCTCGGAGCAAAAA
CCGAAGTGGTGAACTACTGTACCGAAGCGCCGTTTATTCAAACGTTATGCCCGACGCTGGTGTTGGG
GCCTGGCTCAATTAATCAGGCTCATCAACCTGATGAATATCTGGAAACACGGTTTATCAAGCCCACCC
GCGAACTGATAACCCAGGTAATTCACCATTTTTGCTGGCATTAAAACGTAGGCCGGATAAGGCGCTC
GCGCCGCATCCGGCGCTGTTGCCAAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATGCTTGCGCATC
TTATCCGACCTACAGTGACTCAAACGATGCCCAACCGTAGGCCGGATAAGGCGCTCGCGCCGCATCC
GGCACTGTTGCCAAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATACTTGCGCATCTTATCCGACCG
ACAGTGACTCAAACGATGCCCAACTGTAGGCCGGATAAGGCGCTCGCGCCGCATCCGGCACTGTTG
CCAAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATACTTGCGCATCTTATCCGACCTACACCTTTGGT
GTTACTTGGGGCGATTTTTTAACATTTCCATAAGTTACGCTTATTTAAAGCGTCGTGAATTTAATGAC
GTAAATTCCTGCTATTTATTCGTTTGCTGAAGCGATTTCGCAGCATTTGACGTCACCGCTTTTACGTG
GCTTTATAAAAGACGACGAAAAGCAAAGCCCGAGCATATTCGCGCCAATGCTAGCAAGAGGAGAAG
TCGACATGACAGACTTAAATAAAGTGGTAAAAGAACTTGAAGCTCTTGGTATTTATGACGTAAAAGA
AGTTGTTTACAATCCAAGCTACGAGCAATTGTTCGAAGAAGAAACTAAACCAGGTTTAGAAGGCTTT
GAAAAAGGTACTTTAACTACGACTGGTGCAGTGGCAGTAGATACAGGTATCTTCACAGGTCGTTCTC
CAAAAGATAAATATATCGTGTTAGATGAAAAAACCAAAGATACTGTTTGGTGGACATCTGAAACAGC
AAAAAACGACAACAAGCCAATGAACCAAGCTACATGGCAAAGCTTAAAAGACTTGGTAACCAACCA
GCTTTCTCGTAAACGCTTATTTGTAGTTGATGGTTTCTGTGGTGCGAGCGAACACGACCGTATTGCA
GTACGTATTGTCACTGAAGTAGCGTGGCAAGCACATTTTGTAAAAAATATGTTTATTCGCCCAACTGA
AGAACAACTCAAAAATTTTGAACCAGATTTCGTTGTAATGAATGGTTCTAAAGTAACCAATCCAAACT
GGAAAGAACAAGGTTTAAATTCAGAAAACTTTGTTGCTTTCAACTTGACTGAACGCATTCAATTAATC
GGTGGTACTTGGTACGGCGGTGAAATGAAAAAAGGTATGTTCTCAATCATGAACTACTTCCTACCAC
TTAAAGGTGTTGGTGCAATGCACTGCTCAGCTAACGTTGGTAAAGATGGCGATGTAGCAATCTTCTT
CGGCTTATCTGGCACAGGTAAAACAACCCTTTCAACGGATCCAAAACGTGAATTAATCGGTGACGAT
GAACACGGCTGGGATGATGTGGGTATCTTTAACTTTGAAGGTGGTTGCTATGCGAAAACCATTCACC
TTTCAGAAGAAAATGAACCAGATATTTACCGCGCTATCCGTCGCGACGCATTATTAGAAAACGTGGT
TGTTCGTGCAGATGGTTCTGTTGATTTCGATGATGGTTCAAAAACAGAAAATACTCGCGTGTCTTACC
CAATTTATCACATTGATAACATTGTAAAACCAGTTTCTCGTGCAGGTCACGCAACTAAAGTGATTTTC
TTAACTGCAGATGCATTTGGCGTATTACCACCAGTATCTAAATTGACACCAGAACAAACTAAATACTA
CTTCTTATCTGGTTTCACAGCAAAATTAGCAGGTACTGAACGTGGTATTACTGAACCAACTCCAACTT
TCTCAGCATGTTTCGGTGCTGCGTTCTTAACCCTTCACCCAACTCAATATGCAGAAGTGTTAGTAAAA
CGTATGCAAGCAGTGGGTGCTGAAGCTTACTTAGTAAATACTGGTTGGAATGGCACAGGCAAACGT
ATCTCAATCAAAGATACTCGCGGAATCATTGATGCAATCTTAGATGGCTCAATTGAAAAAGCTGAAA
TGGGCGAATTACCAATCTTTAACTTAGCCATTCCTAAAGCATTACCAGGTGTAGATTCTGCAATCTTA
GATCCTCGCGATACTTACGCAGATAAAGCACAATGGCAATCAAAAGCTGAAGACTTAGCAGGTCGTT
TTGTGAAAAACTTTGTTAAATATGCAACTAACGAAGAAGGCAAAGCTTTAATTGCAGCTGGTCCTAA
AGCTTAATCTAGAAAGCTTCCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCC
TTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGT

Fig.48

AGGACGAATTCACTTCTGTTCTAACACCCTCGTTTTCAATATATTTCTGTCTGCATTTTATTCAAATTCT
GAATATACCTTCAGATATCCTTAAGGAATTGTCGTTACATTCGGCGATATTTTTTCAAGACAGGTTCT
TACTATGCATTCCACAGAAGTCCAGGCTAAACCTCTTTTTAGCTGGAAAGCCCTGGGTTGGGCACTG
CTCTACTTTTGGTTTTTCTCTACTCTGCTACAGGCCATTATTTACATCAGTGGTTATAGTGGCACTAAC
GGCATTCGCGACTCGCTGTTATTCAGTTCGCTGTGGTTGATCCCGGTATTCCTCTTTCCGAAGCGGAT
TAAAATTATTGCCGCAGTAATCGGCGTGGTGCTATGGGCGGCCTCTCTGGCGGCGCTGTGCTACTAC
GTCATCTACGGTCAGGAGTTCTCGCAGAGCGTTCTGTTTGTGATGTTCGAAACCAACACCAACGAAG
CCAGCGAGTATTTAAGCCAGTATTTCAGCCTGAAAATTGTGCTTATCGCGCTGGCCTATACGGCGGT
GGCAGTTCTGCTGTGGACACGCCTGCGCCCGGTCTATATTCCAAAGCCGTGGCGTTATGTTGTCTCTT
TTGCCCTGCTTTATGGCTTGATTCTGCATCCGATCGCCATGAATACGTTTATCAAAAACAAGCCGTTT
GAGAAAACGTTGGATAACCTGGCCTCGCGTATGGAGCCTGCCGCACCGTGGCAATTCCTGACCGGC
TATTATCAGTATCGTCAGCAACTAAACTCGCTAACAAAGTTACTGAATGAAAATAATGCCTTGCCGCC
ACTGGCTAATTTCAAAGATGAATCGGGTAACGAACCGCGCACTTTAGTGCTGGTGATTGGCGAGTC
GACCCAGCGCGGACGCATGAGTCTGTACGGTTATCCGCGTGAAACCACGCCGGAGCTGGATGCGCT
GCATAAAACCGATCCGAATCTGACCGTGTTTAATAACGTAGTTACGTCTCGTCCGTACACCATTGAAA
TCCTGCAACAGGCGCTGACCTTTGCCAATGAAAAGAACCCGGATCTGTATCTGACGCAGCCGTCGCT
GATGAACATGATGAAACAGGCGGGTTATAAAACCTTC

Fig.48 (tiếp theo)

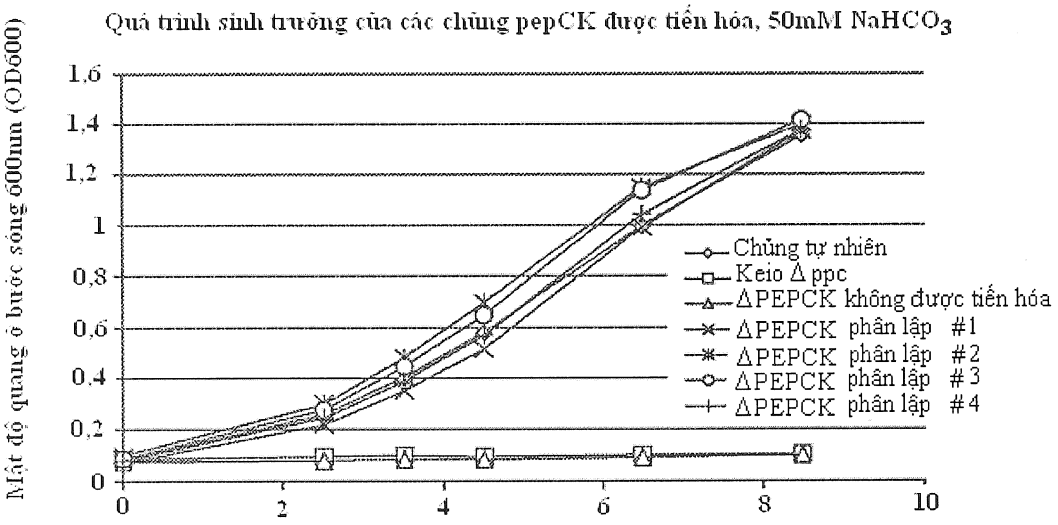

Quá trình sinh trưởng của các chủng pepCK được tiến hóa, 50mM NaHCO3
Mật độ quang ở bước sóng 600nm (OD600)
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
2
4
6
8
10
Chủng tự nhiên
Keio Δ ppc
ΔPEPCK không được tiến hóa
ΔPEPCK phân lập #1
ΔPEPCK phân lập #2
ΔPEPCK phân lập #3
ΔPEPCK phân lập #4

Fig.49

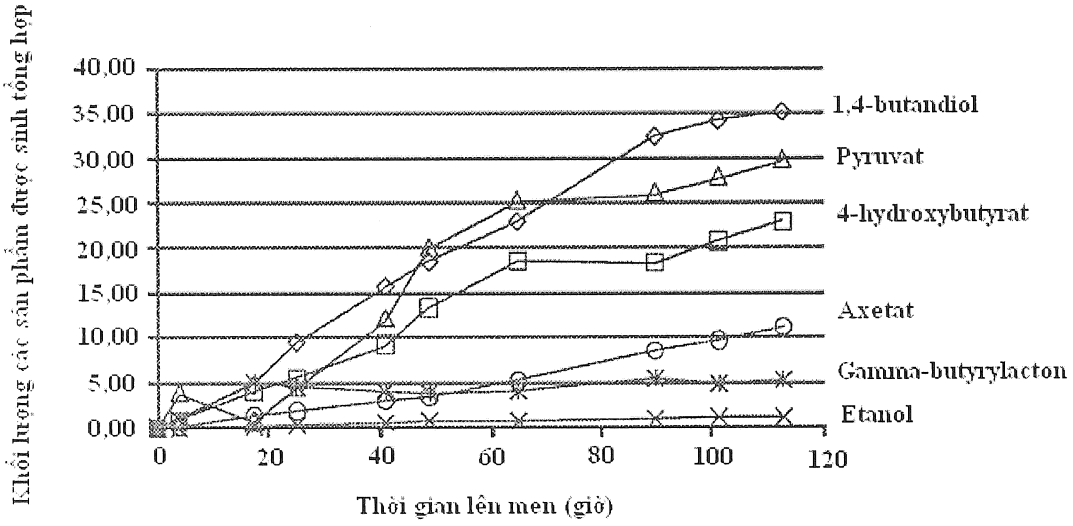

Khối lượng các sản phẩm được sinh tổng hợp
40,00
35,00
30,00
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
0
20
40
60
80
100
120
Thời gian lên men (giờ)
1,4-butandiol
Pyruvat
4-hydroxybutyrat
Axetat
Gamma-butyrylacton
Etanol

Fig.50

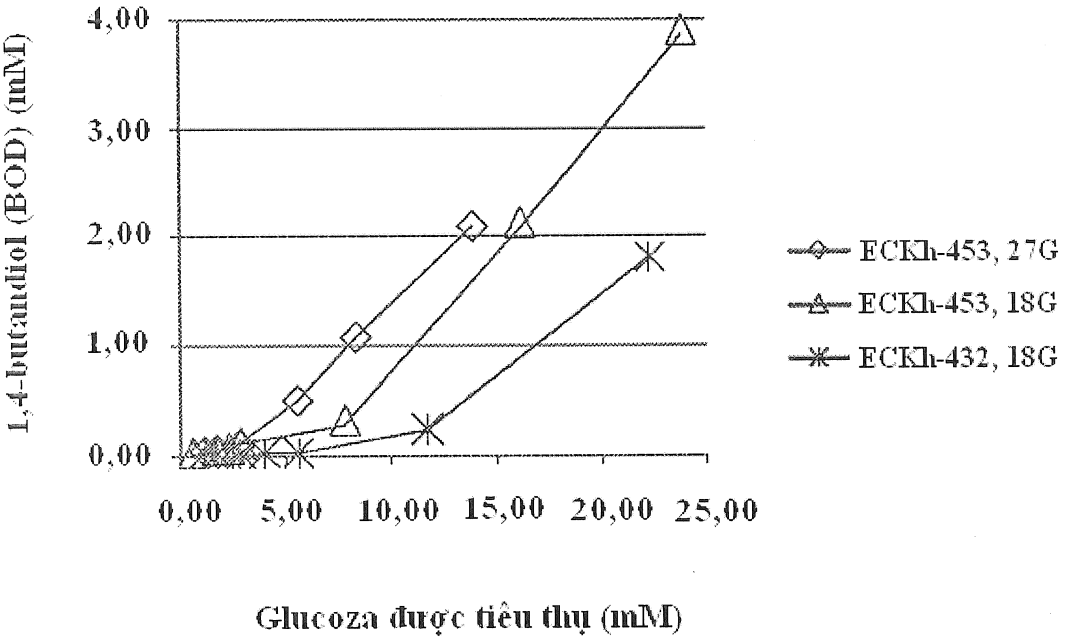

1,4-butandiol (BOD) (mM)
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
Glucoza được tiêu thụ (mM)
ECKh-453, 27G
ECKh-453, 18G
ECKh-432, 18G

Fig.51

AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCACCTCGAGAATTGTGAGCGGATAACAATTGACATTG
TGAGCGGATAACAAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTGACCGAATTCAATTAAGCTAGCAA
GAGGAGAAGTCGAGATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAACAACTTTTTGCCCGCTATGGCTTACC
AGCACCGGTGGGTTATGCCTGTACTACTCCGCGCGAAGCAGAAGAAGCCGCTTCAAAAATCGGTGC
CGGTCCGTGGGTAGTGAAATGTCAGGTTCACGCTGGTGGCCGCGGTAAAGCGGGCGGTGTGAAAG
TTGTAAACAGCAAAGAAGACATCCGTGCTTTTGCAGAAAACTGGCTGGGCAAGCGTCTGGTAACGT
ATCAAACAGATGCCAATGGCCAACCGGTTAACCAGATTCTGGTTGAAGCAGCGACCGATATCGCTAA
AGAGCTGTATCTCGGTGCCGTTGTTGACCGTAGTTCCCGTCGTGTGGTCTTTATGGCCTCCACCGAA
GGCGGCGTGGAAATCGAAAAAGTGGCGGAAGAAACTCCGCACCTGATCCATAAAGTTGCGCTTGAT
CCGCTGACTGGCCCGATGCCGTATCAGGGACGCGAGCTGGCGTTCAAACTGGGTCTGGAAGGTAAA
CTGGTTCAGCAGTTCACCAAAATCTTCATGGGCCTGGCGACCATTTTCCTGGAGCGCGACCTGGCGT
TGATCGAAATCAACCCGCTGGTCATCACCAAACAGGGCGATCTGATTTGCCTCGACGGCAAACTGGG
CGCTGACGGCAACGCACTGTTCCGCCAGCCTGATCTGCGCGAAATGCGTGACCAGTCGCAGGAAGA
TCCGCGTGAAGCACAGGCTGCACAGTGGGAACTGAACTACGTTGCGCTGGACGGTAACATCGGTTG
TATGGTTAACGGCGCAGGTCTGGCGATGGGTACGATGGACATCGTTAAACTGCACGGCGGCGAACC
GGCTAACTTCCTTGACGTTGGCGGCGGCGCAACCAAAGAACGTGTAACCGAAGCGTTCAAAATCAT
CCTCTCTGACGACAAAGTGAAAGCCGTTCTGGTTAACATCTTCGGCGGTATCGTTCGTTGCGACCTG
ATCGCTGACGGTATCATCGGCGCGGTAGCAGAAGTGGGTGTTAACGTACCGGTCGTGGTACGTCTG
GAAGGTAACAACGCCGAACTCGGCGCGAAGAAACTGGCTGACAGCGGCCTGAATATTATTGCAGCA
AAAGGTCTGACGGATGCAGCTCAGCAGGTTGTTGCCGCAGTGGAGGGGAAATAATGTCCATTTTAA
TCGATAAAAACACCAAGGTTATCTGCCAGGGCTTTACCGGTAGCCAGGGGACTTTCCACTCAGAACA
GGCCATTGCATACGGCACTAAAATGGTTGGCGGCGTAACCCCAGGTAAAGGCGGCACCACCCACCT
CGGCCTGCCGGTGTTCAACACCGTGCGTGAAGCCGTTGCTGCCACTGGCGCTACCGCTTCTGTTATC
TACGTACCAGCACCGTTCTGCAAAGACTCCATTCTGGAAGCCATCGACGCAGGCATCAAACTGATTA
TCACCATCACTGAAGGCATCCCGACGCTGGATATGCTGACCGTGAAAGTGAAGCTGGATGAAGCAG
GCGTTCGTATGATCGGCCCGAACTGCCCAGGCGTTATCACTCCGGGTGAATGCAAAATCGGTATCCA
GCCTGGTCACATTCACAAACCGGGTAAAGTGGGTATCGTTTCCCGTTCCGGTACACTGACCTATGAA
GCGGTTAAACAGACCACGGATTACGGTTTCGGTCAGTCGACCTGTGTCGGTATCGGCGGTGACCCG
ATCCCGGGCTCTAACTTTATCGACATTCTCGAAATGTTCGAAAAAGATCCGCAGACCGAAGCGATCG
TGATGATCGGTGAGATCGGCGGTAGCGCTGAAGAAGAAGCAGCTGCGTACATCAAAGAGCACGTT
ACCAAGCCAGTTGTGGGTTACATCGCTGGTGTGACTGCGCCGAAAGGCAAACGTATGGGCCACGCG
GGTGCCATCATTGCCGGTGGGAAAGGGACTGCGGATGAGAAATTCGCTGCTCTGGAAGCCGCAGG
CGTGAAAACCGTTCGCAGCCTGGCGGATATCGGTGAAGCACTGAAAACTGTTCTGAAATAATCTAGC
AAGAGGAGAAGTCGACATGGAAATCAAAGAAATGGTGAGCCTTGCACGCAAGGCTCAGAAGGAGT
ATCAAGCTACCCATAACCAAGAAGCAGTTGACAACATTTGCCGAGCTGCAGCAAAAGTTATTTATGA
AAATGCAGCTATTCTGGCTCGCGAAGCAGTAGACGAAACCGGCATGGGCGTTTACGAACACAAAGT
GGCCAAGAATCAAGGCAAATCCAAAGGTGTTTGGTACAACCTCCACAATAAAAAATCGATTGGTATC
CTCAATATAGACGAGCGTACCGGTATGATCGAGATTGCAAAGCCTATCGGAGTTGTAGGAGCCGTA
ACGCCGACGACCAACCCGATCGTTACTCCGATGAGCAATATCATCTTTGCTCTTAAGACCTGCAATGC
CATCATTATTGCCCCCCACCCCAGATCCAAAAAATGCTCTGCACACGCAGTTCGTCTGATCAAAGAAG
CTATCGCTCCGTTCAACGTACCGGAAGGTATGGTTCAGATCATCGAAGAACCCAGCATCGAGAAGAC
GCAGGAACTCATGGGCGCCGTAGACGTAGTAGTTGCTACGGGTGGTATGGGCATGGTGAAGTCTG
CATATTCTTCAGGAAAGCCTTCTTTCGGTGTTGGAGCCGGTAACGTTCAGGTGATCGTGGATAGCAA
CATCGATTTCGAAGCTGCTGCAGAAAAAATCATCAC

Fig.52

CGGTCGTGCTTTCGACAACGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGCATCATCTACAACGAGGCTGAC
AAGGAAGCAGTTTTCACAGCATTCCGCAACCACGGTGCATATTTCTGTGACGAAGCCGAAGGAGAT
CGGGCTCGTGCAGCTATCTTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGATGTAGTAGGTCAGAGCGTTGCC
TTCATTGCCAAGAAAGCAAACATCAATATCCCCGAGGGTACCCGTATTCTCGTTGTTGAAGCTCGCG
GCGTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAAGATGTGTCCCGTAATGTGCGCCCTCAGCTACA
AGCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCCAACGAAGGTAACGGCCACACCT
GTGCTATCCACTCCAACAATCAGGCACACATCATCCTCGCAGGATCAGAGCTGACGGTATCTCGTAT
CGTAGTGAATGCTCCGAGTGCCACTACAGCAGGCGGTCACATCCAAAACGGTCTTGCCGTAACCAAT
ACGCTCGGATGCGGATCATGGGGTAATAACTCTATCTCCGAGAACTTCACTTACAAGCACCTCCTCA
ACATTTCACGCATCGCACCGTTGAATTCAAGCATTCACATCCCCGATGACAAAGAAATCTGGGAACT
CTAATCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGCAACTTTTCAAACTCAAGAGTGTAACACATCACTTTGA
CACTTTTGCAGAATTTGCCAAGGAATTCTGTCTTGGAGAACGCGACTTGGTAATTACCAACGAGTTC
ATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGCCAGCTCCCCTGCCATTTTGTTATGCAGGAGAAATATGGGC
AAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGAATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCG
CGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGTTATTGACATCTCTAAACTTTTCGTTCTGAAAGGATTAAAT
GATGTACTCGATGCATTCGACCGCAAAATACCTCTTATCAAAGAGAAAGAACTGATCATTGTGCCCA
CAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGACGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAAGCCGTCACACCA
AAATGGGATTGGCTGACGATGCCATTGTTGCAGACCATGCCATCATCATACCTGAACTTCTGAAGAG
CTTGCCTTTCCACTTCTACGCATGCAGTGCAATCGATGCTCTTATCCATGCCATCGAGTCATACGTATC
TCCTAAAGCCAGTCCATATTCTCGTCTGTTCAGTGAGGCGGCTTGGGACATTATCCTGGAAGTATTCA
AGAAAATCGCCGAACACGGCCCTGAATACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCA
ACTATGCCGGTATAGCCTTCGGAAATGCAGGAGTAGGAGCCGTCCACGCACTATCCTACCCGTTGGG
AGGCAACTATCACGTGCCGCATGGAGAAGCAAACTATCAGTTCTTCACAGAGGTATTCAAAGTATAC
CAAAAGAAGAATCCTTTCGGCTATATAGTCGAACTCAACTGGAAGCTCTCCAAGATACTGAACTGCC
AGCCCGAATACGTATATCCGAAGCTGGATGAACTTCTCGGATGCCTTCTTACCAAGAAACCTTTGCAC
GAATACGGCATGAAGGACGAAGAGGTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAAG
ATTGCTCGCCAACAACTACGTAGAGCTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTAC
TAATCTAGAAAGCTTCCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTC
GTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGACCTAGGC
GTTCGGCTGCGACACGTCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTA
GAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGACCATGGCTAATTCCCAT

Fig.52 (tiếp theo)

GCTGCCGAACCAACCCGGGTTACCTCGCCACTCGTTGCCGAGCGGGCCGCTGCGGCCGCCCCGCAG
GCACCCCCCAAGCCGGCCGACACCGCGGCCGCGGGCAACGGCGTGGTCGCCGCACTGGCCGCCAA
AACTGCCGTTCCCCCGCCAGCCGAAGGTGACGAGGTAGCGGTGCTGCGCGGCGCCGCCGCGGCCG
TCGTCAAGAACATGTCCGCGTCGTTGGAGGTGCCGACGGCGACCAGCGTCCGGGCGGTCCCGGCCA
AGCTACTGATCGACAACCGGATCGTCATCAACAACCAGTTGAAGCGGACCCGCGGCGGCAAGATCT
CGTTCACGCATTTGCTGGGCTACGCCCTGGTGCAGGCGGTGAAGAAATTCCCGAACATGAACCGGC
ACTACACCGAAGTCGACGGCAAGCCCACCGCGGTCACGCCGGCGCACACCAATCTCGGCCTGGCGA
TCGACCTGCAAGGCAAGGACGGGAAGCGTTCCCTGGTGGTGGCCGGCATCAAGCGGTGCGAGACC
ATGCGATTCGCGCAGTTCGTCACGGCCTACGAAGACATCGTACGCCGGGCCCGCGACGGCAAGCTG
ACCACTGAAGACTTTGCCGGCGTGACGATTTCGCTGACCAATCCCGGAACCATCGGCACCGTGCATT
CGGTGCCGCGGCTGATGCCCGGCCAGGGCGCCATCATCGGCGTGGGCGCCATGGAATACCCCGCC
GAGTTTCAAGGCGCCAGCGAGGAACGCATCGCCGAGCTGGGCATCGGCAAATTGATCACTTTGACC
TCCACCTACGACCACCGCATCATCCAGGGCGCGGAATCGGGCGACTTCCTGCGCACCATCCACGAGT
TGCTGCTCTCGGATGGCTTCTGGGACGAGGTCTTCCGCGAACTGAGCATCCCATATCTGCCGGTGCG
CTGGAGCACCGACAACCCCGACTCGATCGTCGACAAGAACGCTCGCGTCATGAACTTGATCGCGGC
CTACCGCAACCGCGGCCATCTGATGGCCGATACCGACCCGCTGCGGTTGGACAAAGCTCGGTTCCGC
AGTCACCCCGACCTCGAAGTGCTGACCCACGGCCTGACGCTGTGGGATCTCGATCGGGTGTTCAAG
GTCGACGGCTTTGCCGGTGCGCAGTACAAGAAACTGCGCGACGTGCTGGGCTTGCTGCGCGATGCC
TACTGCCGCCACATCGGCGTGGAGTACGCCCATATCCTCGACCCCGAACAAAAGGAGTGGCTCGAA
CAACGGGTCGAGACCAAGCACGTCAAACCCACTGTGGCCCAACAGAAATACATCCTCAGCAAGCTC
AACGCCGCCGAGGCCTTTGAAACGTTCCTACAGACCAAGTACGTCGGCCAGAAGCGGTTCTCGCTG
GAAGGCGCCGAAAGCGTGATCCCGATGATGGACGCGGCGATCGACCAGTGCGCTGAGCACGGCCT
CGACGAGGTGGTCATCGGGATGCCGCACCGGGGCCGGCTCAACGTGCTGGCCAACATCGTCGGCA
AGCCGTACTCGCAGATCTTCACCGAGTTCGAGGGCAACCTGAATCCGTCGCAGGCGCACGGCTCCG
GTGACGTCAAGTACCACCTGGGCGCCACCGGGCTGTACCTGCAGATGTTCGGCGACAACGACATTC
AGGTGTCGCTGACCGCCAACCCGTCGCATCTGGAGGCCGTCGACCCGGTGCTGGAGGGATTGGTGC
GGGCCAAGCAGGATCTGCTCGACCACGGAAGCATCGACAGCGACGGCCAACGGGCGTTCTCGGTG
GTGCCGCTGATGTTGCATGGCGATGCCGCGTTCGCCGGTCAGGGTGTGGTCGCCGAGACGCTGAAC
CTGGCGAATCTGCCGGGCTACCGCGTCGGCGGCACCATCCACATCATCGTCAACAACCAGATCGGCT
TCACCACCGCGCCCGAGTATTCCAGGTCCAGCGAGTACTGCACCGACGTCGCAAAGATGATCGGGG
CACCGATCTTTCACGTCAACGGCGACGACCCGGAGGCGTGTGTCTGGGTGGCGCGGTTGGCGGTGG
ACTTCCGACAACGGTTCAAGAAGGACGTCGTCATCGACATGCTGTGCTACCGCCGCCGCGGGCACA
ACGAGGGTGACGACCCGTCGATGACCAACCCCTACATGTACGACGTCGTCGACACCAAGCGCGGGG
CCCGCAAAAGCTACACCGAAGCCCTGATCGGACGTGGCGACATCTCGATGAAGGAGGCCGAGGAC
GCGCTGCGCGACTACCAGGGCCAGCTGGAACGGGTGTTCAACGAAGTGCGCGAGCTGGAGAAGCA
CGGTGTGCAGCCGAGCGAGTCGGTCGAGTCCGACCAGATGATTCCCGCGGGGCTGGCCACTGCGG
TGGACAAGTCGCTGCTGGCCCGGATCGGCGATGCGTTCCTCGCCTTGCCGAACGGCTTCACCGCGCA
CCCGCGAGTCCAACCGGTGCTGGAGAAGCGCCGGGAGATGGCCTATGAAGGCAAGATCGACTGGG
CCTTTGGCGAGCTGCTGGCGCTGGGCTCGCTGGTGGCCGAAGGCAAGCTGGTGCGCTTGTCGGGGC
AGGACAGCCGCCGCGGCACCTTCTCCCAGCGGCATTCGGTTCTCATCGACCGCCACACTGGCGAGG
AGTTCACACCACTGCAGCTGCTGGCGACCAACTCCGACGGCAGCCCGACCGGCGGAAAGTTCCTGG
TCTACGACTCGCCACTGTCGGAGTACGCCGCCGTCGGCTTCGAGTACGGCTACACTGTGGGCAATCC
GGACGCCGTGGTGCTCTGGGAGGCGCAGTTCGGCGACTTCGTCAACGGCGCACAGTCGATCATCGA

Fig.53

CGAGTTCATCAGCTCCGGTGAGGCCAAGTGGGGCCAATTGTCCAACGTCGTGCTGCTGTTACCGCAC
GGGCACGAGGGGCAGGGACCCGACCACACTTCTGCCCGGATCGAACGCTTCTTGCAGTTGTGGGCG
GAAGGTTCGATGACCATCGCGATGCCGTCGACTCCGTCGAACTACTTCCACCTGCTACGCCGGCATG
CCCTGGACGGCATCCAACGCCCGCTGATCGTGTTCACGCCCAAGTCGATGTTGCGTCACAAGGCCGC
CGTCAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCCGCTCAGTGCTGGAGGAACCCACCTATGA
GGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTCAGCCGGATCCTGCTGACCAGTGGCAAGCTGTATTACGA
GCTGGCCGCCCGCAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACAGCTCGC
CCCGCTGCCCAGGCGTCGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAACGTCAAGGAGTTCTTCTG
GGTCCAAGAGGAACCGGCCAACCAGGGTGCGTGGCCGCGATTCGGGCTCGAACTACCCGAGCTGCT
GCCTGACAAGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCCGTCGTCAGGCTC
GTCGAAGGTGCACGCCGTCGAACAGCAGGAGATCCTCGACGAGGCGTTCGGCTAATCTAGCAAGA
GGAGAAGTCGACATGAAGTTATTAAAATTGGCACCTGATGTTTATAAATTTGATACTGCAGAGGAGT
TTATGAAATACTTTAAGGTTGGAAAAGGTGACTTTATACTTACTAATGAATTTTTATATAAACCTTTCC
TTGAGAAATTCAATGATGGTGCAGATGCTGTATTTCAGGAGAAATATGGACTCGGTGAACCTTCTGA
TGAAATGATAAACAATATAATTAAGGATATTGGAGATAAACAATATAATAGAATTATTGCTGTAGGG
GGAGGATCTGTAATAGATATAGCCAAAATCCTCAGTCTTAAGTATACTGATGATTCATTGGATTTGTT
TGAGGGAAAAGTACCTCTTGTAAAAAACAAAGAATTAATTATAGTTCCAACTACATGTGGAACAGGT
TCAGAAGTTACAAATGTATCAGTTGCAGAATTAAAGAGAAGACATACTAAAAAAGGAATTGCTTCA
GACGAATTATATGCAACTTATGCAGTACTTGTACCAGAATTTATAAAAGGACTTCCATATAAGTTTTT
TGTAACCAGCTCCGTAGATGCCTTAATACATGCAACAGAAGCTTATGTATCTCCAAATGCAAATCCTT
ATACTGATATGTTTAGTGTAAAAGCTATGGAGTTAATTTTAAATGGATACATGCAAATGGTAGAGAA
AGGAAATGATTACAGAGTTGAAATAATTGAGGATTTTGTTATAGGCAGCAATTATGCAGGTATAGCT
TTTGGAAATGCAGGAGTGGGAGCGGTTCACGCACTCTCATATCCAATAGGCGGAAATTATCATGTGC
CTCATGGAGAAGCAAATTATCTGTTTTTTACAGAAATATTTAAAACTTATTATGAGAAAAATCCAAAT
GGCAAGATTAAAGATGTAAATAAACTATTAGCAGGCATACTAAAATGTGATGAAAGTGAAGCTTAT
GACAGTTTATCACAACTTTTAGATAAATTATTGTCAAGAAAACCATTAAGAGAATATGGAATGAAAG
AGGAAGAAATTGAAACTTTTGCTGATTCAGTAATAGAAGGACAGCAGAGACTGTTGGTAAACAATT
ATGAACCTTTTTTCAAGAGAAGACATAGTAAACACATATAAAAAGTTATATTAATCTAGAAAGCTTCCT
AGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTC
GGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGACCTA

Fig.53 (tiếp theo)

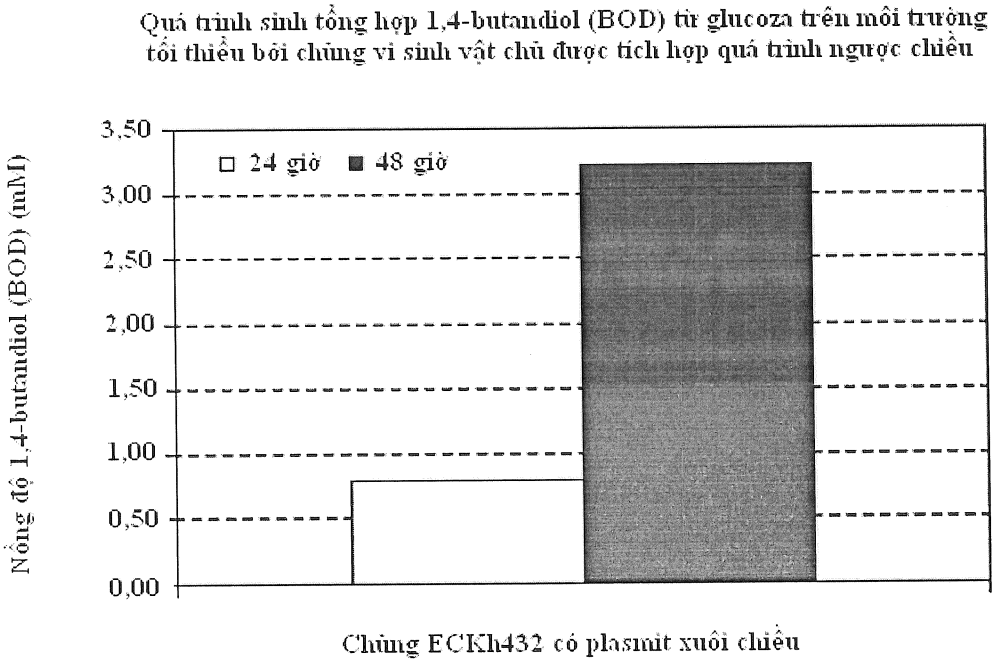

Quá trình sinh tổng hợp 1,4-butandiol (BOD) từ glucoza trên môi trường tối thiểu bởi chủng vi sinh vật chủ được tích hợp quá trình ngược chiều
Nồng độ 1,4-butandiol (BOD) (mM)
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
24 giờ
48 giờ
Chủng ECKh432 có plasmit xuôi chiều

Fig.54

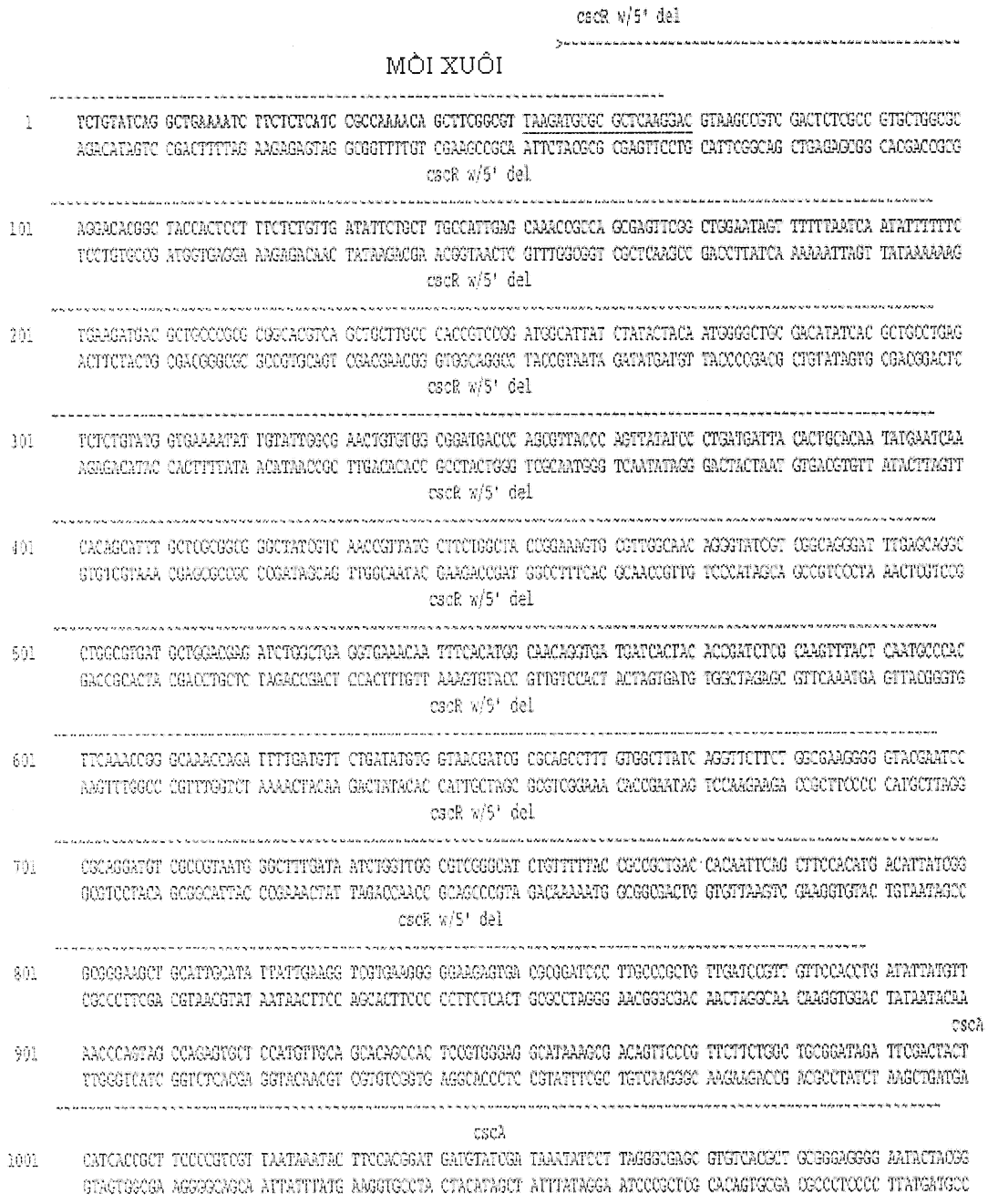

cscR w/5' del
MỒI XUÔI
cscR w/5' del
cscR w/5' del
cscR w/5' del
cscR w/5' del
cscR w/5' del
cscR w/5' del
cscR w/5' del
cscA
cscA

Fig.55



Fig.55 (tiếp theo)

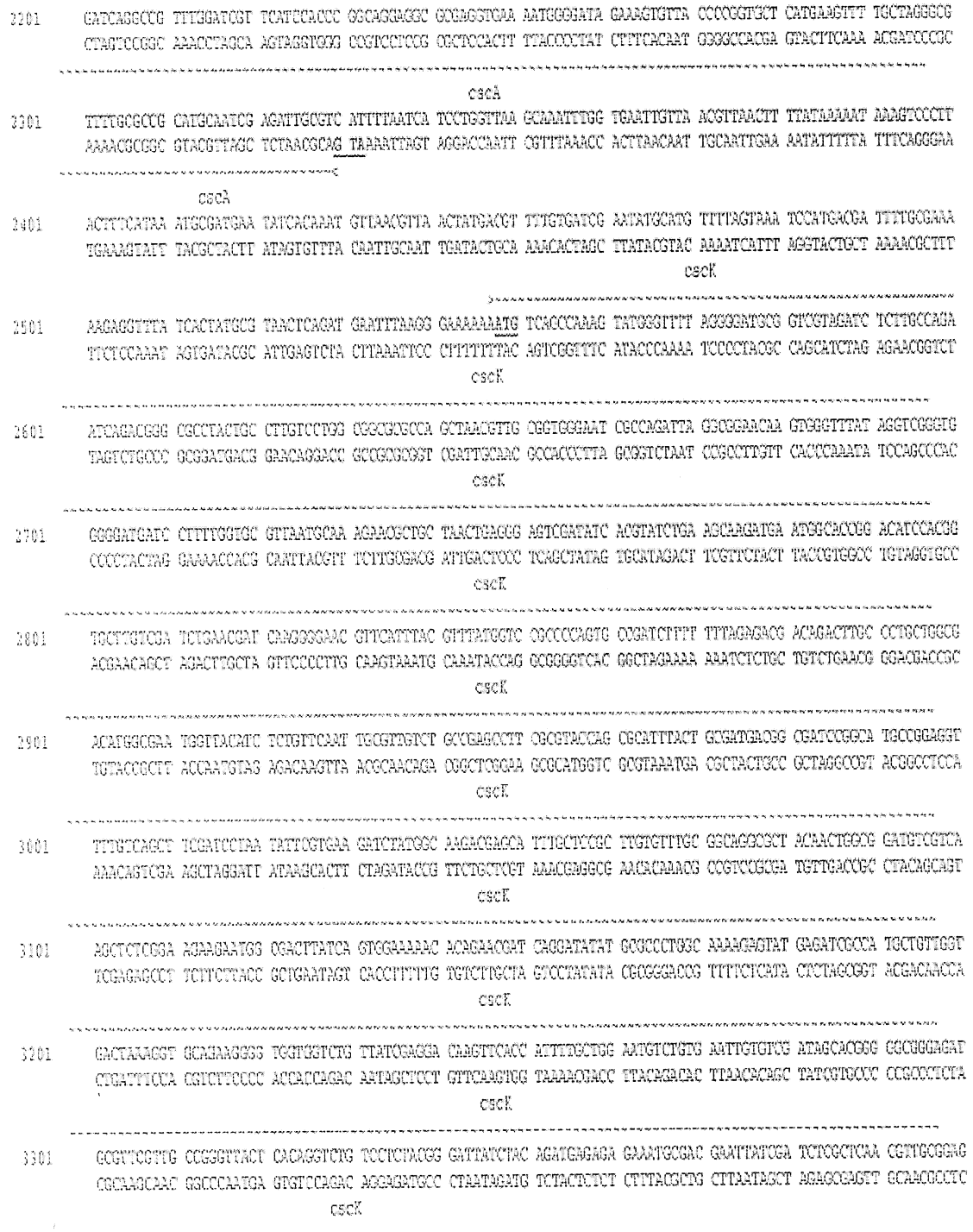


Fig.55 (tiếp theo)

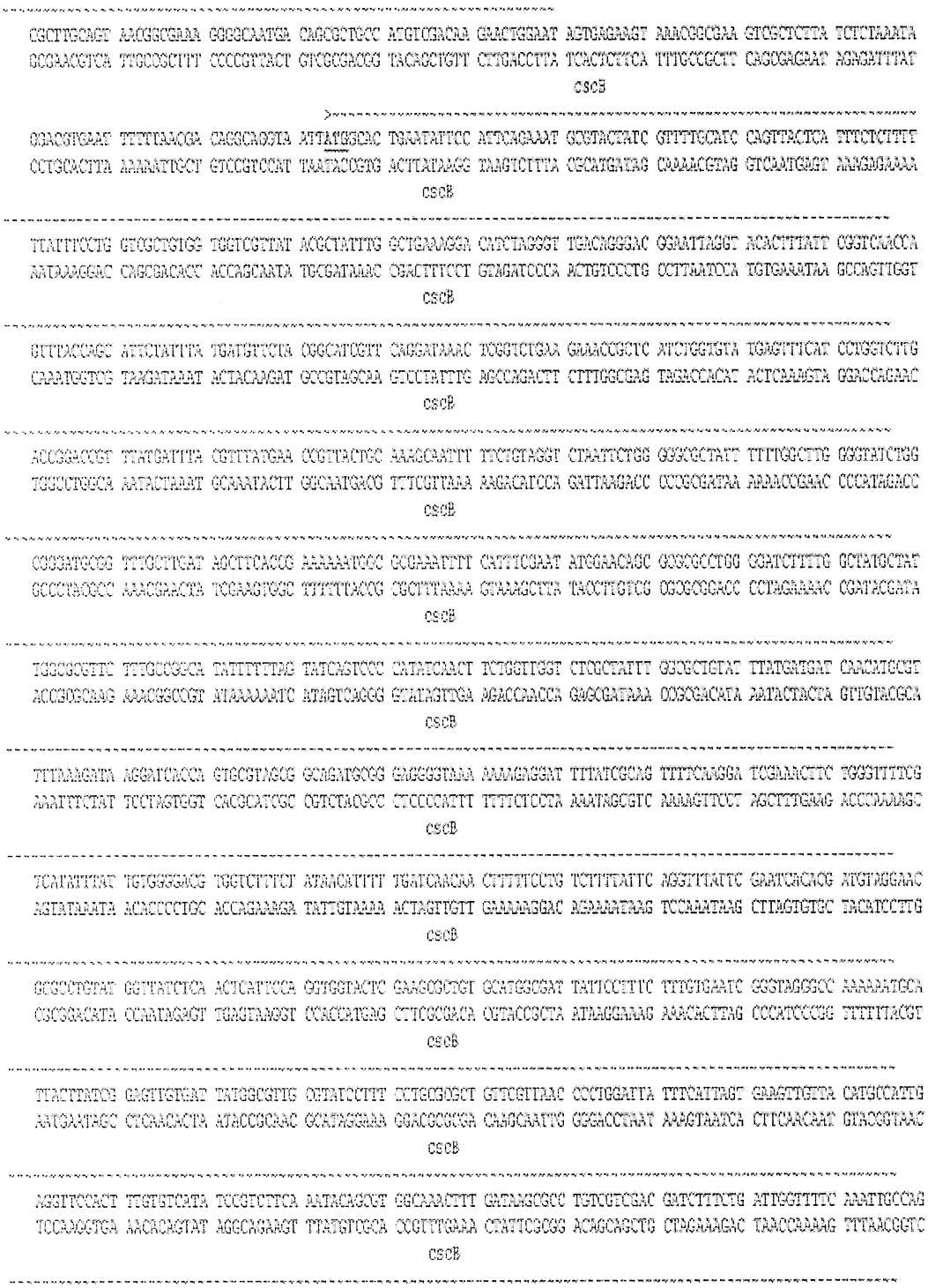


Fig.55 (tiếp theo)

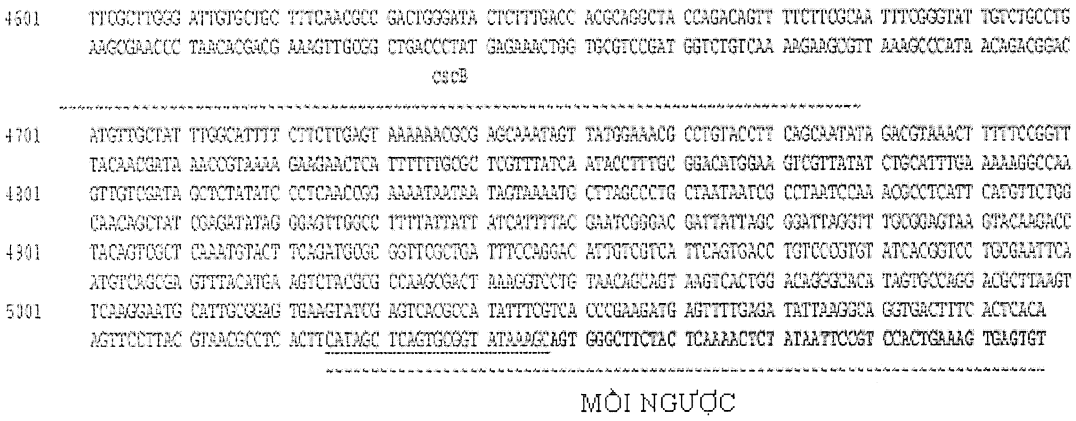


Fig.55 (tiếp theo)

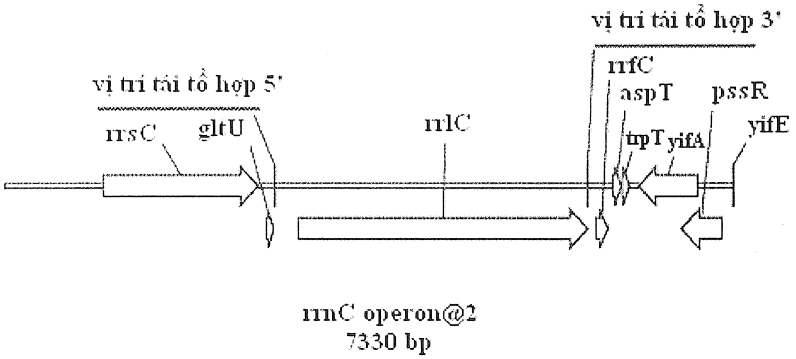

vị trí tái tổ hợp 3'
rrfC
aspT
pssR
vị trí tái tổ hợp 5'
rrsC
gltU
rrlC
trpT
yifA
yifE
rrnC operon@2
7330 bp

Fig.56

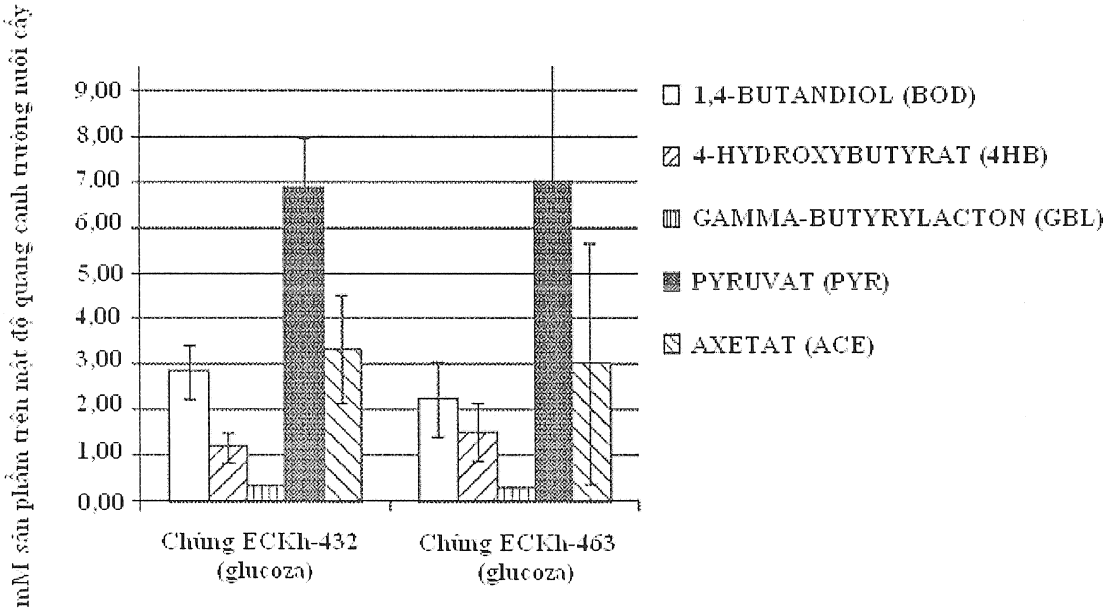

mM sản phẩm trên mật độ quang cuối trường nuôi cấy
9,00
8,00
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
Chủng ECKh-432 (glucoza)
Chủng ECKh-463 (glucoza)
1,4-BUTANDIOL (BOD)
4-HYDROXYBUTYRAT (4HB)
GAMMA-BUTYRYLACTON (GBL)
PYRUVAT (PYR)
AXETAT (ACE)

Fig.57